

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Testung molekular-zielgerichteter Therapieoptionen,
am Beispiel des spezifischen GSK3-Inhibitors
AR-A014418, an humanen neuroendokrinen
Tumorzelllinien in vitro**

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
An der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Carla Katharina Weis
Aus Freiburg im Breisgau
2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph J. Auernhammer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Rainer Glaß
Prof. Dr. Kirsten Lauber

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Svenja Nölting

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2021

Carla Weis
Dänen Str. 2
10439 Berlin

Eidesstattliche Erklärung zu meiner Dissertation mit dem Titel:

**„Testung molekular-gerichteter Therapieoptionen, am Beispiel des
spezifischen GSK3-Inhibitors AR-A014418, an humanen neuroendokrinen
Tumorzelllinien in vitro “**

Hiermit erkläre ich, dass ich die beigelegte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommenen Erkenntnisse habe ich als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigelegte Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass diesem Promotionsverfahren keine bestandenen oder endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Berlin, 08.07.2021

Carla Weis

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

I)	TABELLENVERZEICHNIS	5
II)	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	6
III)	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	10
1)	EINLEITUNG.....	12
1.1.	KLINISCHER HINTERGRUND.....	12
a)	Definition Neuroendokrine Neoplasien.....	12
b)	Epidemiologie.....	12
c)	Klassifikation.....	13
d)	Klinik.....	14
e)	Therapie.....	16
f)	Prognose.....	17
1.2	MOLEKULARE GRUNDLAGEN.....	18
a)	Definition Glykogensynthase-Kinase 3.....	18
b)	Regulierung der Glykogensynthase-Kinase 3.....	18
c)	Funktion der Glykogensynthase-Kinase 3.....	19
d)	Intrazelluläre vorgeschaltete Signalwege (Upstream-Signaling) der Glykogensynthase-Kinase 3.....	19
e)	Effektorproteine.....	23
f)	Intrazelluläre nachgeschaltete Signalwege.....	25
g)	Glykogensynthase-Kinase 3 und Apoptose.....	28
2)	ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT.....	30
3)	MATERIAL UND METHODEN.....	31
3.1)	MATERIAL.....	31
3.2)	METHODEN.....	37
4)	ERGEBNISSE.....	51
4.1)	GLYKOGENSYNTHASE-KINASE 3-HEMMUNG.....	51
4.2)	ZELLPROLIFERATION.....	53
4.3)	ZELLMIGRATION.....	66
4.4)	BESTRAHLUNG.....	70
4.5)	DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS).....	73
4.6)	CASPASE-ASSAY.....	76
4.7)	ZELLZYKLUSPROTEINE UND REZEPTOR-TYROSINKINASEN.....	80
5)	DISKUSSION.....	84
6)	ZUSAMMENFASSUNG.....	96
IV)	LITERATURVERZEICHNIS.....	97
V)	ANHANG.....	122
VI)	DANKSAGUNG.....	158

I) Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Einteilung der NEN in die Stadien G1 – G3 laut WHO 2017.....	13
Tabelle 2:	Neuroendokrine Syndrome.....	15
Tabelle 3:	Auflistung aller verwendeter Chemikalien und Reagenzien.....	31/32
Tabelle 4:	Auflistung aller verwendeter Verbrauchsmaterialien und Laborzubehör.....	33
Tabelle 5:	Auflistung aller verwendeter Geräte.....	34
Tabelle 6:	Auflistung aller verwendeter primärer Antikörper [1].....	35
Tabelle 7:	Auflistung aller verwendeter sekundärer Antikörper [1].....	36
Tabelle 8:	Zusammensetzung aller im Western Blot benutzten Puffer.....	43
Tabelle 9:	Gelrezept für zwei 1,5 mm-SDS-Gele.....	44
Tabelle 10:	Zellproliferation nach AR-A014418-Gabe nach 144 h [1].....	54
Anhang Tabelle 1:	Zellsuspensionen Bestrahlung.....	122
Anhang Tabelle 2:	Zellüberleben nach 72 h AR-A014418-Inkubation [1].....	123
Anhang Tabelle 3:	Zellüberleben nach AR-A014418- und Everolimus-Gabe in BON1-Zellen [1].....	123
Anhang Tabelle 4:	Zellüberleben nach AR-A014418- und Everolimus-Gabe in QGP1-Zellen [1]	123
Anhang Tabelle 5:	Zellüberleben nach AR-A014418- und Everolimus-Gabe in H727-Zellen [1].....	124
Anhang Tabelle 6:	Zellüberleben nach AR-A014418- und Lovastatin-Gabe in BON1-Zellen [1].....	124
Anhang Tabelle 7:	Zellüberleben nach AR-A014418- und Lovastatin-Gabe in QGP1-Zellen [1].....	124
Anhang Tabelle 8:	Zellüberleben nach AR-A014418- und Lovastatin-Gabe in H727-Zellen [1].....	125
Anhang Tabelle 9:	Zellüberleben nach AR-A014418- und 5-FU-Gabe in BON1-Zellen [1].....	125
Anhang Tabelle 10:	Zellüberleben nach AR-A014418- und 5-FU-Gabe in QGP1-Zellen [1].....	125
Anhang Tabelle 11:	Zellüberleben nach AR-A014418- und 5-FU-Gabe in H727-Zellen [1].....	126
Anhang Tabelle 12:	Bestrahlung nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1]..	126
Anhang Tabelle 13:	Bestrahlung nach AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1]..	127
Anhang Tabelle 14:	Bestrahlung nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1]..	127

Anhang Tabelle 15: Caspase-Aktivität nach 72 h AR-A014418-Inkubation [1]... 128

Anhang Tabelle 16: Caspase-Aktivität nach 144 h AR-A014418-Inkubation [1]. 128

II) Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: schematische Darstellung des PI3K/Akt/mTORC- und Raf-1/MEK/ERK-Weges.....	22
Abbildung 2: schematische Darstellung der Effektorproteine von der GSK3.....	23
Abbildung 3: schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Weges.....	27
Abbildung 4: schematische Darstellung des NOTCH-Signalweges.....	27
Abbildung 5: schematische Darstellung des intrinsischen Apoptoseweges sowie die Rolle der GSK3.....	28
Abbildung 6: Western Blot der GSK3 α/β -Expression [1].....	51
Abbildung 7: Quantifizierung der Western Blots von GSK3 α/β [1].....	52
Abbildung 8: Western Blot der GSK3 α/β -Hemmung [1].....	53
Abbildung 9: Zellüberleben nach AR-A014418-Gabe in GOT1-Zellen [1].....	55
Abbildung 10: Zellüberleben nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1].....	56
Abbildung 11: Zellüberleben nach AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1].....	57
Abbildung 12: Zellüberleben nach AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1].....	58
Abbildung 13: Western Blot von Regulator- und Zellzyklusproteinen [1].....	60
Abbildung 14: Western Blot von Act und ERK nach AR-A014418-Kurzinkubation [1].....	61
Abbildung 15: Zellüberleben nach AR-A014418- plus Lovastatin-Gabe in BON1-Zellen [1].....	62
Abbildung 16: Zellüberleben nach AR-A014418- plus Lovastatin-Gabe in QGP1-Zellen [1].....	63
Abbildung 17: Western Blot von Akt und ERK nach AR-A014418- plus Lovastatin-Gabe [1].....	64
Abbildung 18: Zellüberleben nach AR-A014418- plus 5-FU-Gabe in QGP1-Zellen [1].....	65
Abbildung 19: Zellmigration nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1].....	67
Abbildung 20: Quantifizierung der Zellmigration nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1].....	67
Abbildung 21: Zellmigration nach AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1].....	68
Abbildung 22: Quantifizierung der Zellmigration nach AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1].....	68
Abbildung 23: Zellmigration nach AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1].....	69

Abbildung 24: Quantifizierung der Zellmigration nach AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1].....	69
Abbildung 25: Western Blot von β -Catenin [1].....	70
Abbildung 26: Bestrahlung nach 2 μ M AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1]....	71
Abbildung 27: Bestrahlung nach 2 μ M AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1]....	72
Abbildung 28: FACS-Analyse BON1-Zellen nach AR-A014418-Gabe [1].....	73
Abbildung 29: FACS-Analyse H727-Zellen nach AR-A014418-Gabe [1].....	74
Abbildung 30: FACS-Analyse QGP1-Zellen nach AR-A014418-Gabe [1].....	75
Abbildung 31: FACS-Analyse GOT1-Zellen nach AR-A014418-Gabe [1].....	76
Abbildung 32: Western Blot von LC3All in BON1-Zellen [1].....	77
Abbildung 33: Caspase-Assay nach 144 h AR-A014418-Inkubation [1].....	78
Abbildung 34: Caspase-Assay nach 72 h AR-A014418-Inkubation [1].....	79
Abbildung 35: Western Blot von Proteinen der Apoptose.....	80
Abbildung 36: Western Blot von Bcl2.....	81
Abbildung 37: Western Blot von Cyclin D1.....	82
Abbildung 38: Western Blot von IGF1R.....	83
Anhang Abbildung 1: Quantifizierung der Western Blots von GSK3 α/β nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1].....	129
Anhang Abbildung 2: Quantifizierung der Western Blots von GSK3 α/β nach AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1].....	130
Anhang Abbildung 3: Quantifizierung der Western Blots von GSK3 α/β nach AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1].....	131
Anhang Abbildung 4: Quantifizierung der Western Blots von GSK3 α/β nach AR-A014418-Gabe in GOT1-Zellen [1].....	132
Anhang Abbildung 5: Quantifizierung der Western Blots von S6 nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1].....	133
Anhang Abbildung 6: Quantifizierung der Western Blots von p70S6K nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1].....	133
Anhang Abbildung 7: Quantifizierung der Western Blots von 4EBP1 nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1].....	134
Anhang Abbildung 8: Quantifizierung der Western Blots von S6 nach AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1].....	134
Anhang Abbildung 9: Quantifizierung der Western Blots von p70S6K nach AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1].....	135
Anhang Abbildung 10: Quantifizierung der Western Blots von 4EBP1 nach AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1].....	135

Anhang Abbildung 11: Quantifizierung der Western Blots von S6 nach AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1].....	136
Anhang Abbildung 12: Quantifizierung der Western Blots von p70S6K nach AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1].....	136
Anhang Abbildung 13: Quantifizierung der Western Blots von 4EBP1 nach AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1].....	137
Anhang Abbildung 14: Quantifizierung der Western Blots von S6 nach AR-A014418-Gabe in GOT1-Zellen [1].....	137
Anhang Abbildung 15: Quantifizierung der Western Blots von p70S6K nach AR-A014418-Gabe in GOT1-Zellen [1].....	138
Anhang Abbildung 16: Quantifizierung der Western Blots von 4EBP1 nach AR-A014418-Gabe in GOT1-Zellen [1].....	138
Anhang Abbildung 17: Quantifizierung der Western Blots von Akt nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1].....	139
Anhang Abbildung 18: Quantifizierung der Western Blots von Akt nach AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1].....	139
Anhang Abbildung 19: Quantifizierung der Western Blots von Akt nach AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1].....	140
Anhang Abbildung 20: Quantifizierung der Western Blots von Akt nach AR-A014418-Gabe in GOT1-Zellen [1].....	140
Anhang Abbildung 21: Quantifizierung der Western Blots von ERK nach AR-A014418-Kurzinkubation in BON1-Zellen [1].....	141
Anhang Abbildung 22: Quantifizierung der Western Blots von ERK nach AR-A014418- Kurzinkubation in QGP1-Zellen [1].....	141
Anhang Abbildung 23: Quantifizierung der Western Blots von ERK nach AR-A014418-Kurzinkubation in H727-Zellen [1].....	142
Anhang Abbildung 24: Quantifizierung der Western Blots von ERK nach AR-A014418-Kurzinkubation in GOT1-Zellen [1].....	142
Anhang Abbildung 25: Zellüberleben nach AR-A014418- und Everolimus-Gabe in BON1-Zellen [1].....	143
Anhang Abbildung 26: Zellüberleben nach AR-A014418- und Everolimus-Gabe in QGP1-Zellen [1].....	144
Anhang Abbildung 27: Zellüberleben nach AR-A014418- und Everolimus-Gabe in H727-Zellen [1].....	145
Anhang Abbildung 28: Zellüberleben nach AR-A014418- und Lovastatin-Gabe in H727-Zellen [1].....	146

Anhang Abbildung 29: Zellüberleben nach AR-A014418- und 5-FU-Gabe in H727-Zellen [1].....	147
Anhang Abbildung 30: Zellüberleben nach AR-A014418- und 5-FU-Gabe in BON1-Zellen [1].....	148
Anhang Abbildung 31: Quantifizierung der Western Blots von β -Catenin nach AR-A014418-Gabe [1].....	149
Anhang Abbildung 32: Quantifizierung der Western Blots von Bcl-2 nach AR-A014418-Gabe [1].....	150
Anhang Abbildung 33: Quantifizierung der Western Blots von Cyclin D3 nach AR-A014418-Gabe [1].....	151
Anhang Abbildung 34: Quantifizierung der Western Blots von Chk1 nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1].....	152
Anhang Abbildung 35: Quantifizierung der Western Blots von Chk1 nach AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1].....	152
Anhang Abbildung 36: Quantifizierung der Western Blots von Chk1 nach AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1].....	153
Anhang Abbildung 37: Quantifizierung der Western Blots von Chk1 nach AR-A014418-Gabe in GOT1-Zellen [1].....	153
Anhang Abbildung 38: Quantifizierung der Western Blots von EGFR nach AR-A014418-Gabe [1].....	154/155
Anhang Abbildung 39: Bestrahlung nach 1 μ M AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1].....	156
Anhang Abbildung 40: Bestrahlung nach 1 μ M AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1].....	156
Anhang Abbildung 41: Bestrahlung nach 1 μ M AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1].....	157
Anhang Abbildung 42: Bestrahlung nach 2 μ M AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1].....	157

III) Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
5-FU	5-Fluorouracil
APC	anaphase promoting complex
ASCL1	Achaete-scute homolog 1
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl	B-cell lymphoma
CDK	Cyclin-abhängigen Kinasen
CgA	Chromogranin A
Chk1	Checkpoint-Kinase1
CK1	Casein kinase 1
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DDT	DL-Dithiothreitol
dest	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dsh	Dishevelled
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor-Rezeptor
eIF	eukaryotic translation initiation factor
ENETS	European Neuroendocrine Tumor Society
ERK	extracellular signal-regulated kinases
FKS	Fetales Kälberserum
FOXO	forkhead box O
Fz	Frizzled
GEPNET-KUM	GastroEnteroPankreatischen Systems am Klinikum der Universität München
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
H727	NCI-H727
HCl	Hydrochlorid
Hes-1	hairy and enhancer of split-1
IGF1R	Insulin-like Growth Factor 1-Rezeptor
LC3A	light chain 3A
M-PER™	Mammalian-Protein Extraction Reagent
Mdm2	mouse double minute 2 homolog
MEK	MAPK/ERK kinase
MEN 1	Multiple endokrine Neoplasie Typ 1
MEN 4	Multiple endokrine Neoplasie Typ 4
MinEN	Mixed neuroendocrine non-neuroendocrine Neoplasia
mTOR	mechanistic target of rapamycin
mTORC1	mechanistic target of rapamycin complex 1
mTORC2	mechanistic target of rapamycin complex 2
NaCl	Natriumchlorid

NaN ₃	Natriumazid
NEC	Neuroendokrines Karzinom
NECD	extrazelluläre NOTCH-Domäne
NEN	Neuroendokrine Neoplasien
NET	Neuroendokriner Tumor
NF	Neurofibromatose
NF-κB	nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
NICD	intrazelluläre NOTCH-Domäne
p70S6K	p70 ribosomal protein S6 kinase
p90Rsk	p90 ribosomal s6 kinase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PRRT	Peptid-Rezeptor-Radionuklid-Therapie
PTEN	phosphatase and tensin homolog
Raf-1	rapidly accelerated fibrosarcoma-1
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
SSR	Somatostatinrezeptor
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSC	Tuberöse Sklerose
TSC2	tuberous sclerosis complex 2
U	Umdrehung
UICC	Union Internationale contre le Cancer
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor-Rezeptor
VHL	Von Hippel-Lindau
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1) Einleitung

1.1. Klinischer Hintergrund

a) Definition Neuroendokrine Neoplasien

Neuroendokrine Neoplasien (NEN) stellen eine heterogene Gruppe von Tumoren dar, die dem diffusen endokrinen System entstammen und funktionelle sowie morphologische Merkmale endokrinen Gewebes aufweisen [2]. Sie exprimieren biochemische Marker wie Chromogranin A (CgA) [3] und Synaptophysin [4], welche immunhistochemisch zum Nachweis einer NEN angefärbt werden können.

Erstmals beschrieben wurden NEN 1907 von Siegfried Oberndorfer [5]. Er prägte den Begriff des Karzinoids, dem vorwiegend historische Bedeutung zukommt [6].

NEN können in allen Organsystemen des Körpers vorkommen [7-9], am häufigsten betroffen sind hierbei das gastroenteropankreatische mit 67,5 %, gefolgt von dem bronchopulmonalen System mit 25,3 % aller NEN [10].

b) Epidemiologie

NEN stellen etwa 0,49 % aller malignen Tumorerkrankungen in den USA dar und sind somit eine seltene Erkrankung [10]. Je nach Primärlokalisation kann die organspezifische Inzidenz stark von der Gesamtinzidenz abweichen. Für gastroenteropankreatische NEN lag die Gesamtinzidenz bei 3,65/100.000 in den Jahren 2003 bis 2007 in den USA [11]. Die Daten stammen aus dem Surveillance, Epidemiology and End Results Program (SEER) des National Cancer Institutes.

In den letzten 30 Jahren konnte eine starke Zunahme von NEN in den USA beobachtet werden [12-14], ähnliche Daten wurden in Europa erhoben [15]. Der Grund für die Inzidenzzunahme scheint durch die verbesserten Diagnostikmöglichkeiten nicht ausreichend erklärt, andere Erklärungsansätze fehlen jedoch bislang [14].

NEN können sporadisch oder im Rahmen eines hereditären Syndroms auftreten [16], assoziierte Syndrome sind hierbei das multiple endokrine Neoplasie Typ 1 (MEN 1)- Syndrom [17-19], das von Hippel-Lindau (VHL)-Syndrom, die Neurofibromatose (NF) Typ 1 von Recklinghausen und die Tuberöse Sklerose (TSC) [20, 21], sowie das multiple endokrine Neoplasie Typ 4 (MEN 4)-Syndrom [22].

c) Klassifikation

Das aktuelle Grading der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für NEN des Pankreas aus dem Jahr 2017 [23] und für NEN des Intestinaltrakts aus dem Jahr 2019 [24] unterscheidet jeweils zwischen hoch differenzierten Neuroendokrinen Tumoren (NET) und gering differenzierten Neuroendokrinen Karzinomen (NEC), zusammengefasst unter dem Begriff der Neuroendokrinen Neoplasien (NEN) [25].

Jede neuroendokrine Neoplasie hat ein malignes Potential [24, 25].

Die histologische Graduierung in G1, G2 und G3 geschieht anhand des Proliferationsgrades. Der Proliferationsgrad wird hierbei durch den Ki-67 (MIB-1)-Proliferationsindex bestimmt; alternativ/ergänzend durch die Anzahl der sich in Mitose befindenden Tumorzellen [25].

Eine Übersicht über das Grading von NEN gemäß WHO 2017/2019 gibt Tabelle 1.

NEN	Grad	Ki-67- Index	Differenzierungsgrad	Bezeichnung
	G1	< 3 %	hoch	NET
	G2	3 % - 20 %	hoch	NET
	G3	> 20 %	hoch	NET
			gering	NEC
				MiNEN (Mixed neuroendocrine-non- neuroendocrine Neoplasia)

Tabelle 1: Einteilung der NEN in die Stadien G1 – G3 laut WHO 2017/2019

Es wurde von der Union Internationale contre le Cancer (UICC) ein Staging für NEN des gastrointestinalen-pankreatischen Systems vorgeschlagen [26] – aktuell gültig ist die 8. Auflage der UICC aus dem Jahre 2017 [27]. Die Einteilung orientiert sich hierbei an der TNM-Klassifikation der Tumorentitäten der jeweiligen Organe. Berücksichtigt werden u.a. die Größe des Tumors, die Tiefeninfiltration und der Metastasierungsgrad.

d) Klinik

NEN lassen sich in funktionelle und nicht-funktionelle Neoplasien einteilen [25]. Funktionelle Tumore verursachen entsprechend den Hormonen, die sie sezernieren, charakteristische Symptome/klinisch Syndrome. Die Hypersekretionssyndrome von NEN im Gastrointestinalbereich werden entsprechend ihrer Lokalisation benannt - einen Überblick über Symptome und Tumortyp gibt Tabelle 2 auf der nächsten Seite.

Nicht-funktionelle NEN weisen unspezifische Symptome wie Bauchschmerzen oder Darmobstruktion auf und stellen oft einen Zufallsbefund dar [28, 29].

Tumor	Syndrom-name	Leitsymptom	Hormon	Primär-lokalisation
Karzinoid	Karzinoid-Syndrom	<ul style="list-style-type: none"> • Flush-Attacken • wässrige Diarrhoe • Hedinger-Syndrom • asthmatische Beschwerden • Teleangiektasien 	Serotonin, Kallikrein, Bradykinin	Jejunum/ Ileum, Bronchialsystem, Pankreas, sonstiger Gastrointestinaltrakt
Insulinom		Hypoglykämie	Insulin	Pankreas
VIPom	Verner-Morrison-Syndrom	Wässrige Durchfälle	Vasoaktives intestinales Peptid (VIP)	Pankreas
Glukagonom	Diabetes-Dermatose-Syndrom	<ul style="list-style-type: none"> • Diabetes mellitus • nekrolytisches Erythema migrans (Exanthem) 	Glukagon	Pankreas
Gastrinom	Zollinger-Ellison-Syndrom	<ul style="list-style-type: none"> • Rezidivierende peptische Ulzera • Diarrhoe 	Gastrin	Pankreas, Duodenum
Somatostatinom		<ul style="list-style-type: none"> • Gallensteine • Diabetes mellitus 	Somatostatin	Pankreas, Duodenum

Tabelle 2: *Neuroendokrine Syndrome*. Funktionelle NET werden dem Hormon, das sie sezernieren, entsprechend benannt. Die Symptome ergeben sich ebenfalls aus der Hypersekretion des jeweiligen Hormons [28, 30, 31].

e) Therapie

Chirurgische oder endoskopische Resektion

Die chirurgische oder endoskopische Resektion ist der bisher einzige kurative Therapieansatz von NEN. Vorwiegend bei nicht-metastasierten Tumoren ist die Indikation zur chirurgischen Therapie gegeben, aber auch in der palliativen Situation stellt die Entfernung von Tumorgewebe eine wichtige Therapieoption zur Vermeidung von Komplikationen sowie zur Symptomlinderung dar [32, 33]. Das chirurgische Vorgehen variiert entsprechend der Tumorlokalisation und der Tumorausbreitung sowie der Metastasierung. Die entsprechenden Leitlinien wurden von der European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) herausgegeben und sind auf der Webseite https://www.enets.org/current_guidelines.html einsehbar.

Hierbei kommen neben chirurgisch-operativen Verfahren je nach Tumorlokalisation und -größe auch endoskopische Resektionsverfahren und lokal-ablative Verfahren wie die Radiofrequenzablation oder die Brachytherapie zum Einsatz [32, 34-37].

Medikamentöse Therapie

Die konservative medikamentöse Therapie stellt einen palliativen Therapieansatz dar und hat sowohl die Symptomlinderung der Hypersekretionssyndrome, insbesondere des Karzinoidsyndroms mit Diarrhoe und Flush als auch die Wachstumskontrolle des Tumors zum Ziel [38].

Hierfür sind die Somatostatinanaloga Octreotid LAR (Sandostatin® LAR®, Octreotid Depot) und Lanreotid Autogel (Somatuline Autogel) in neuroendokrinen gastroenteropankreatischen Tumoren zur Symptomkontrolle unabhängig vom Ki-67 und zur Wachstumskontrolle bei einem Ki-67 $\leq 10\%$ etabliert [39]. Sie hemmen über die Bindung an die bei NEN exprimierten Somatostatinrezeptoren (SSR) [40, 41] die Tumorphilierung [42-45] sowie die Hormonsekretion [46, 47].

Somatostatin ist ein Peptidhormon, das hemmende Wirkung sowohl auf die endokrine als auch die exokrine Sekretion von Zellen hat [48-50]. Die SSTR-Expression in G1/G2 gastroenteropankreatischer Tumoren ist in der Mehrzahl der Fälle vorhanden [51].

Bei fehlender SSTR-Expression der Zellen oder unzureichender Symptomkontrolle unter alleiniger Somatostatinanaloga-Gabe kann in Einzelfällen auf Interferon- α zurückgegriffen werden [33, 45] oder zusätzlich zur Somatostatinanaloga-Therapie bei Karzinoidsyndrom auf den oralen Tryptophan-Hydroxylase-Inhibitor Teloristat [52], der die Serotoninproduktion verringert.

Bei hochproliferativen NEC ist der Einsatz einer primären Chemotherapie indiziert, die Standardtherapie ist hierbei eine Kombination aus Cisplatin und Etoposid [39, 53].

Eine weitere Indikation zur primären Chemotherapie ist bei pankreatischen NET mit raschem Progress bzw. Ki-67 > 10 % und/oder hoher initialer Tumorlast gegeben, hierbei kommen Streptozocin/5-Fluorouracil (5-FU) oder Capecitabin/Temozolomid als Therapieprotokolle zum Einsatz [54, 55].

Eine weitere Therapieoption sind die zwei molekular zielgerichteten Substanzen Everolimus und Sunitinib, wobei Everolimus für pankreatische, gastrointestinale und bronchopulmonale NET zugelassen ist [33, 56-58], Sunitinib hingegen nur für pankreatische NET [59].

Sunitinib ist ein Multityrosinkinase-Inhibitor, dessen Hauptwirkmechanismus die verminderte Angiogenese durch Bindung an den Vascular Endothelial Growth Factor-Rezeptor (VEGFR) sowie den Platelet Derived Growth Factor-Rezeptor und der darauffolgenden Hemmung nachgeschalteter Signalwege ist [60-62].

Everolimus ist ein mTOR-Inhibitor, der durch Inhibierung von mechanistic target of rapamycin (mTOR) das Zellwachstum vermindert [63]. Die detaillierte Beschreibung des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Akt/mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1)-Signalweges folgt in dem ebenso benannten Kapitel.

Die Peptid-Rezeptor-Radionuklid-Therapie (PRRT) wird bei inoperablen oder metastasierten NET eingesetzt [28, 64]. Hierbei erfolgt eine spezifische Ligandenbindung von mit Radiopeptid markierten Somatostatinanaloga an SSR-positive Tumorzellen, sodass eine selektive Bestrahlung des Tumorgewebes mit β -Strahlern möglich ist. Zum Einsatz kommen vorzugsweise ^{177}Lu -DOTATATE- [65, 66] und heutzutage nur noch selten ^{90}Y -DOTATOC- [64, 67] markierte Somatostatinanaloga.

f) Prognose

Die Prognose von NEN kann je nach Stadium und Primärlokalisation sehr stark variieren [68]

Die Überlebensrate hängt entscheidend von der Proliferationsrate (Ki-67-Index), dem TNM-Stadium und der Tumorgöße ab [69]. Aufgrund ihres meist langsamen Wachstumsverhaltens werden NEN oft erst bei bereits erfolgter Metastasierung entdeckt.

1.2 Molekulare Grundlagen

a) Definition Glykogensynthase-Kinase 3

Die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) wurde erstmalig 1980 von Cohen in Zusammenhang mit dem Glykogenstoffwechsel beschrieben [70]. Dort phosphoryliert und inhibiert sie die Glykogensynthase, woher sich auch ihr Name ableitet [70].

Die GSK3 ist eine Serin/Threonin-Kinase, die ubiquitär in den Zellen vorkommt mit besonders hoher Konzentration im Gehirn [71].

Beim Menschen sind die zwei Isoformen GSK3 α und GSK3 β bekannt, welche hohe strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen [72]. Ihre Kinasedomänen sind zu 98 % identisch [71], die größten Unterschiede weisen ihre N-Termini auf, welche verantwortlich sind für die verschiedenen Molekulargewichte von 47 kD der GSK3 β und 51 kD der GSK3 α [72]. Trotz ihrer hohen strukturellen Ähnlichkeit werden die zwei Isoformen von zwei unterschiedlichen Genen auf verschiedenen Chromosomen kodiert [73].

b) Regulierung der Glykogensynthase-Kinase 3

Die GSK3 ist eine konstitutiv aktive Kinase mit zwei Phosphorylierungsstellen: Serin 9 und Tyrosin 216 bei der GSK3 β , Serin 21 und Tyrosin 279 bei der GSK3 α [74-77].

Durch Phosphorylierung des Serins wird die GSK3 *inaktiviert* [75, 77], dies kann durch Autophosphorylierung [78] oder durch andere Kinasen reguliert geschehen.

Direkt gehemmt wird die GSK3 hierbei durch die p70 ribosomal protein S6 kinase-1 (p70S6K) [75, 77, 79], Akt [80], die Proteinkinase C [81, 82], die Proteinkinase A [83, 84] und die p90 ribosomal s6 kinase (p90Rsk) [77, 79, 85]. Indirekt wird die GSK3 u.a. von dem epidermal growth factor [86, 87], dem Insulin-like growth factor 1 [86], Insulin [85, 88-90], Hitzeschock [91, 92] oder oxidativem Stress [91] gehemmt.

Durch Phosphorylierung ihres Tyrosins wird die GSK3 hingegen *aktiviert* [74, 93, 94]. Dies geschieht ebenfalls durch Autophosphorylierung [94] oder durch andere Tyrosinkinasen [95]. Die aktive GSK3 wiederum phosphoryliert besonders leicht vorphosphorylierte Substrate [96-99].

c) Funktion der Glykogensynthase-Kinase 3

Auf Zellebene steuert die GSK3 Funktionen wie Zellproliferation [100], Motilität [101] und Apoptose [102, 103], hierbei ist vor allem die Rolle der GSK3 β erforscht.

GSK3 β -Knock-Out-Mäuse sterben bereits im Embryonalstadium an Leberdegeneration [104], was zum einen die Bedeutung der GSK3 in Bezug auf die Zellfunktion unterstreicht, zum anderen aber auch zeigt, dass die GSK3 α einen Ausfall der GSK3 β nicht vollständig kompensieren kann.

Funktionell spielt die GSK3 aber nicht nur für die physiologischen Abläufe in der Zelle eine wichtige Rolle, sondern auch bei der Entstehung von Krankheiten wie Diabetes mellitus Typ II [105, 106], bipolaren Störungen [107], Alzheimer [108, 109] sowie bei der Entstehung mancher Krebsentitäten [110]. So wird die GSK3 bei Leukämie [111-114], Pankreasadenokarzinomen [115-118], Kolonkarzinomen [119, 120] und Prostatakarzinomen [121] als onkogen beschrieben. Auch bei der Entstehung von NET wird eine Beteiligung der GSK3 vermutet [122-126]. Die genaue Rolle der GSK3 hierbei sowie die spezifischen Funktionen der GSK3 α und der GSK3 β sind jedoch noch nicht ausreichend verstanden.

d) Intrazelluläre vorgeschaltete Signalwege (Upstream-Signaling) der Glykogensynthase-Kinase 3

Die Funktion der GSK3 wird durch ein enges Netz von Signaltransduktionswegen reguliert, zwei der wichtigsten sind hierbei die unmittelbar der GSK3 vorgeschalteten Signalwege PI3K/Akt/mTORC1 und rapidly accelerated fibrosarcoma-1 (Raf-1)/MAPK/ERK kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinases (ERK). Sie sind intrazelluläre, stark konservierte Signalwege zur Steuerung der Zellaktivität und regulieren elementare Vorgänge wie das Zellüberleben, das Zellwachstum, die Zellproliferation und die Motilität [127, 128].

Eine Fehl-/Überregulierung innerhalb des PI3K/Akt/mTORC1-Weges kann die Karzinogenese durch unkontrolliertes Zellwachstum, ungehemmte Zellteilung sowie Angiogenese begünstigen [62, 129, 130]. Eine Überaktivität des PI3K/Akt/mTORC1-Signalweges konnte bei Krebsentitäten wie beispielsweise dem Mammakarzinom [131-133], dem Glioblastom [134], dem Endometriumkarzinom [135, 136], dem Melanom [137, 138] sowie bei NET [139, 140] gefunden werden.

Auch die Überregulierung des Raf-1/MEK/ERK-Weges ist in Zusammenhang mit der Entstehung von Krebsarten wie dem Kolon- [141] oder Nierenzellkarzinom [142] beschrieben worden [143].

PI3K/Akt/mTORC1-Signalweg

Am Anfang des PI3K/Akt/mTORC1-Signalweges stehen zellmembranständige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren [144] und Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) wie der Insulin-like Growth Factor 1-Rezeptor (IGF1R) [145-147], die von extrazellulären Wachstumsfaktoren [148], Hormonen [149] oder Guanosintriphosphat-bindenden Proteinen aktiviert werden können. Zur Weiterleitung des Signals in das Innere der Zelle wird zunächst die ebenfalls membranständige PI3K aktiviert, welche das Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu PIP₃ aktiviert/phosphoryliert [129]. PIP₃ wiederum rekrutiert die zytosolische Serin/Threonin-Kinase Akt an die Zellmembran [150], wo diese von der Phosphoinositol-abhängigen Kinase-1 sowie einer anderen Kinase aktiviert/phosphoryliert wird [151, 152].

Akt, auch unter dem Namen Proteinkinase B bekannt, ist das Schlüsselenzym des PI3K/Akt/mTORC1-Signalweges und eines der wichtigsten Regulatorproteine der GSK3. Zum einen kann Akt die GSK3 durch direkte Phosphorylierung ihrer Serine 21/9 hemmen [80], zum anderen kann Akt die GSK3 auch indirekt über eine Aktivierung von mTORC1 hemmen [153].

MTOR

MTOR ist ebenso wie Akt eine intrazelluläre Proteinkinase und wichtiges Regulatorenzym für Zellfunktionen wie Wachstum, Metabolismus und Zellzyklus [154, 155]. MTOR liegt in zwei Komplexen vor: mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) und mechanistic target of rapamycin complex 2 (mTORC2) [156]. MTORC1 kann durch Akt [157, 158], Wachstumsfaktoren [159], Nährstoffe [160] und die GSK3 [161, 162] indirekt aktiviert werden.

Die wichtigsten Effektorproteine von mTORC1 sind p70S6K und das eukaryotic translation initiation factor (eIF) 4E-binding protein 1 (4E-BP1) [163]. P70S6K wird hierbei von mTORC1 aktiviert [75, 154], 4E-BP1 hingegen gehemmt [154, 164].

4E-BP1 ist ein Translationsrepressorprotein, das den Translationsfaktor eIF4E bindet und auf diese Weise inaktiviert [165, 166]. Somit führt eine Hemmung von 4E-BP1 durch eine mTORC1-Aktivierung zu Zellproliferation- und wachstum [167, 168].

p70S6K spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulierung von Zellproliferation- und wachstum [169]. Sie kann nicht nur von mTORC1, sondern auch von der GSK3 aktiviert werden [170], wohingegen p70S6K die GSK3 durch direkte Phosphorylierung hemmt (s. „Regulierung“). So kommt es durch eine mTORC1-Aktivierung über eine aktivierte p70S6K zu einer GSK3-Hemmung, aber auch eine aktive GSK3 limitiert ihre Aktivität p70S6K-vermittelt selbst [153].

Hemmung des PI3K/Akt/mTORC1-Signalweges

Die Hemmung des PI3K/Akt/mTORC1-Signalweges wird vor allem über die Dephosphorylierung von PIP3 zu PIP2 durch das phosphatase and tensin homolog (PTEN) vermittelt [171, 172]. Eine Mutation von PTEN ist hierbei mit der Entstehung von Krebs assoziiert [173, 174].

Aber auch p70S6K kann den PI3K/Akt/mTORC1-Weg über eine Hemmung von insulin receptor substrate-1 vermittelt inhibieren [147, 175, 176]. Somit wirken die GSK3 und mTORC1 durch ihre Aktivierung von p70S6K inhibierend auf Akt.

Zudem wird über die GSK3 eine *negative Rückkopplung* auf die Aktivierung des PI3K/Akt/mTORC1-Weges vermittelt, indem die Hemmung der PTEN durch die GSK3 [177] bei aktiviertem PI3K/Akt/mTORC1-Signalweg aufgehoben ist.

Raf-1/MEK/ERK-Signalweg

Der Raf-1/MEK/ERK-Signalweg wird ebenso wie der PI3K/Akt/mTORC1-Signalweg durch Bindung von Wachstumsfaktoren wie dem epidermal growth factor [178, 179] oder dem vascular endothelial growth factor [180, 181] an die extrazellulären Anteile membranständiger RTKs aktiviert [182]. Die RTKs phosphorylieren das G-Protein Ras [183], was zu einer Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Raf-1 führt [184]. Raf-1 aktiviert nun MEK [185], welche wiederum ERK phosphoryliert/aktiviert [186]. ERK wiederum aktiviert nun eines ihrer etwa 160 Zielsubstrate von Transkriptionsfaktoren, Proteinkinasen und Phosphatasen [187].

Die zwei Signalwege PI3K/Akt/mTORC und Raf-1/MEK/ERK regulieren sich auf vielfältige Weise gegenseitig, einen guten Überblick geben Mendoza et al. (2011) in dem Paper „The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation“ [188].

Details zur genauen Signaltransduktion der im Vorherigen beschriebenen Wege sind Abbildung 1 zu entnehmen.

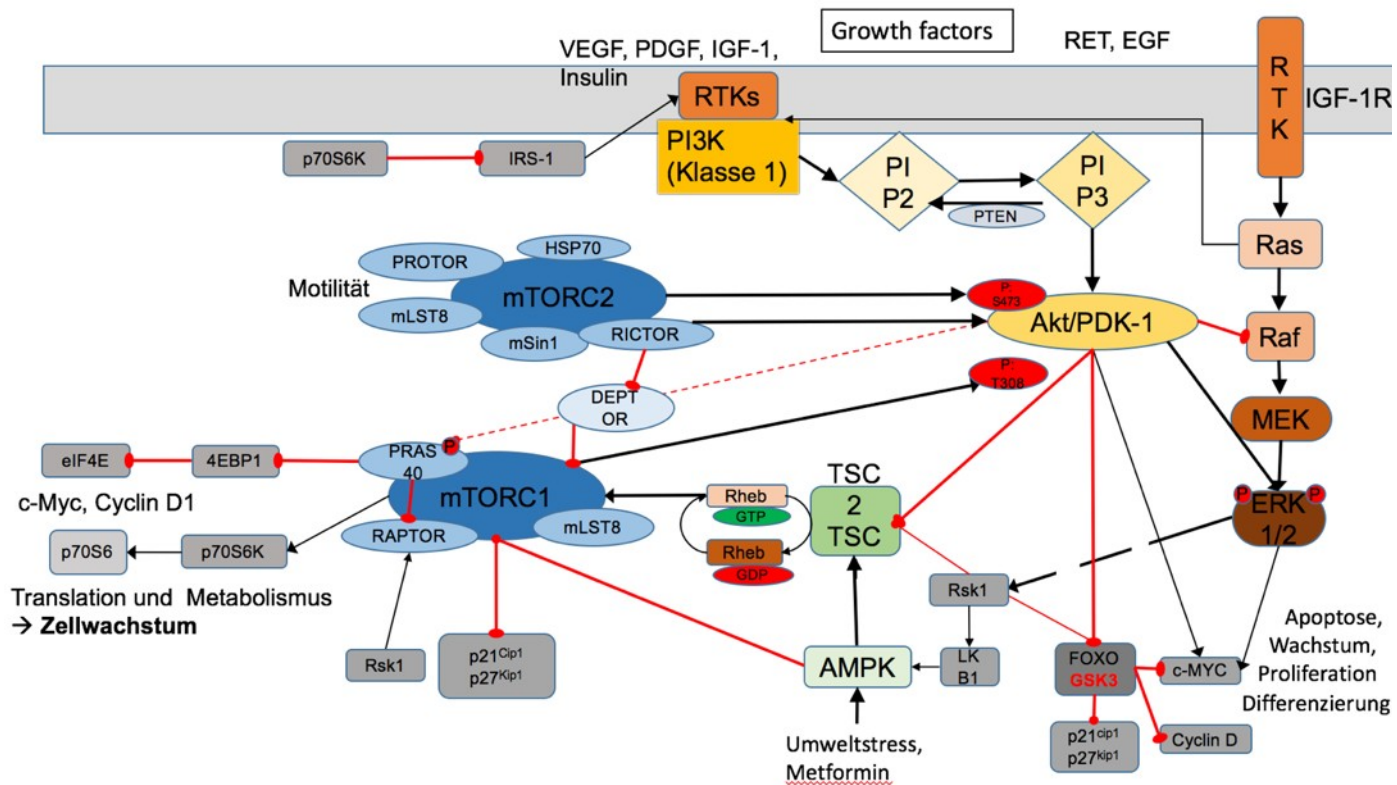


Abbildung 1: schematische Darstellung des PI3K/Akt/mTORC- und Raf-1/MEK/ERK-Weges adaptiert aus [127, 129, 147, 150, 154, 174, 183, 189-193]. Der PI3K/Akt/mTORC- und Raf-1/MEK/ERK-Weg werden durch RTKs aktiviert, dies führt zu einer Hemmung der GSK3 und einer Aktivierung von mTORC1 durch Akt [145-147, 157, 158, 182]. mTORC1 aktiviert wiederum die Kinase p70S6K und hemmt das Translationsrepressorprotein 4E-BP1 [75, 154, 163, 164]. Über eine negative Rückkopplung wird der PI3K/Akt/mTORC-Weg PTEN-vermittelt durch die GSK3 gehemmt [171, 172, 177].

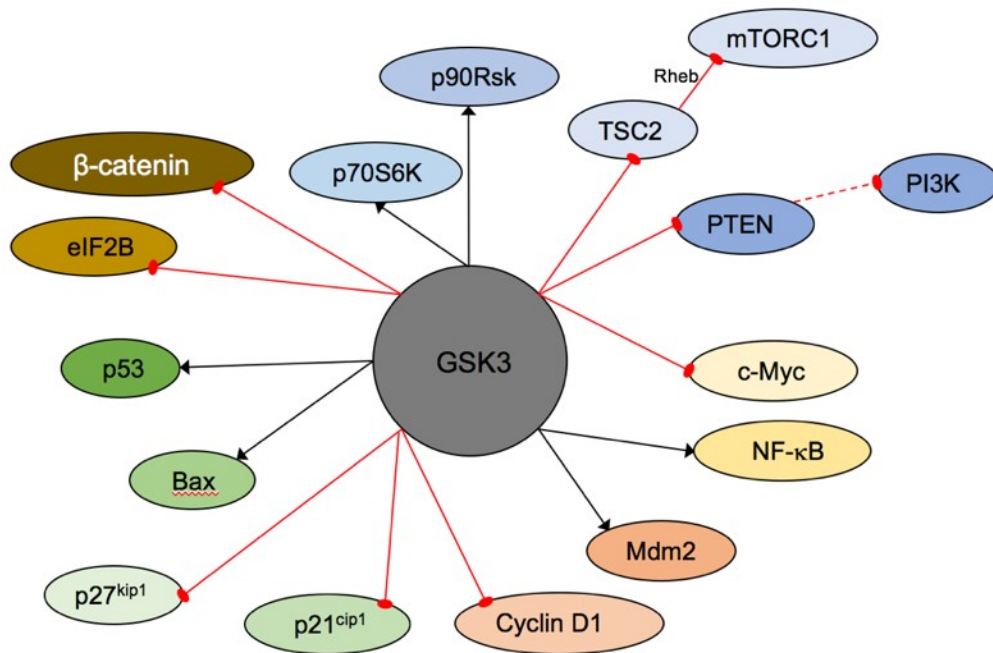


Abbildung 2: schematische Darstellung der Effektorproteine von der GSK3 adaptiert aus [76, 95, 194-196]. Die GSK3 hemmt u.a. $p27^{Kip1}$, $p21^{Cip1}$ und Cyclin D1 und aktiviert u.a. NF- κ B, p70S6K und mittelbar mTORC1 [104, 116, 161, 162, 170, 198, 199, 202, 206, 218, 219].

e) Effektorproteine

Die GSK3 hat ca. 100 Effektorproteine [197]. Die für diese Forschungsarbeit wichtigsten Effektorproteine sind nachfolgend beschrieben und zur Übersicht in Abbildung 2 dargestellt.

Zellzyklus und Apoptose

Die GSK3 *hemmt* Cyclin D1 [198, 199], welches gemeinsam mit den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) 4 und 6 als Zellzykluspromotor der G1-Phase agiert [200]. CDKs bilden gemeinsam mit Cyclinen einen Komplex, der das Fortschreiten einer Zelle im Zellzyklus fördert [201].

Die GSK3 *hemmt* $p21^{Cip1}$ [202], eine Kinase, die alle CDKs hemmen kann [203, 204] und somit das Fortschreiten einer Zelle im Zellzyklus verhindert und tumorsuppressiv wirkt [205].

Die GSK3 *hemmt* $p27^{Kip1}$ [206], ebenfalls ein CDK-Inhibitor, welcher über CDK 2 [207] und 4 [208] seine Zellzyklus-hemmende Wirkung vermittelt.

Die GSK3 *aktiviert* Bcl-2-associated X protein (Bax) [209], ein proapoptotisch wirkendes Protein, das Teil der B-cell lymphoma (Bcl)-Familie ist [210]. Andere

Mitglieder dieser Familie sind u.a. Bcl-2, Bam und Bcl-XL – sie alle haben Einfluss auf die Apoptose [210].

Die GSK3 interagiert über mehrere Mechanismen mit p53, einem der wichtigsten proapoptotischen und somit tumorsuppressiven Proteine des Körpers. Diese Interaktionen werden unter dem Punkt „Apoptose“ näher beschrieben.

Die GSK3 *aktiviert* mouse double minute 2 homolog (Mdm2) [211], den wichtigsten Gegenspieler von p53. Mdm2 kann p53 zum einen für den proteasomalen Abbau ubiquitinieren [212, 213], zum anderen seine transkriptionale Aktivität hemmen [214].

Transkriptionsfaktoren

Die GSK3 *hemmt* das Onkoprotein c-Myc [215], das von dem Gen MYC kodiert wird und Transkriptionsfaktor diverser onkogener Proteine ist [216, 217].

Die GSK3 wirkt direkt und indirekt *aktivierend* auf den Transkriptionsfaktor nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF- κ B) (s. auch Abbildung 4) [104, 116, 218, 219].

NF- κ B verstärkt die Transkription von u.a. Cyclin D1 [220] oder dem antiapoptotisch wirkenden Protein Bcl-2 [221, 222] und wird mit der Angiogenese bei Tumoren sowie einer Metastasierung in Verbindung gebracht [223-226]. Zudem scheint NF- κ B essenziell in der Embryogenese zu sein, denn die in „Funktion“ erwähnten GSK3 β -Knock-out-Mäuse sterben aufgrund der fehlenden Aktivierung von NF- κ B *in utero* [104].

Andere Kinasen

Die Regulierung der folgenden Kinasen durch die GSK3 und ihre Bedeutung wurden bereits in den vorherigen Kapiteln erläutert, sie sind zur Übersicht noch einmal aufgeführt.

Die GSK3 *hemmt* PTEN [227].

Die GSK3 *aktiviert* p70S6K [170], p70S6K hemmt hingegen die GSK3 [79].

Die GSK3 *hemmt* den tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) [161]. TSC2 wiederum hemmt mittelbar über die Inaktivierung von Rheb mTORC1 [162], weshalb eine Hemmung von TSC2 durch die GSK3 eine Aktivierung von mTORC1 bedeutet.

Proteine

Die GSK3 *hemmt* eIF2B [89, 90].

Die GSK3 bindet Axin, Casein kinase 1 (CK1) [228] sowie anaphase promoting complex (APC) [229], bildet einen Komplex mit ihnen und *hemmt* β -Catenin [230].

β -Catenin ist ein Co-Aktivator von Transkriptionsfaktoren, dessen Deregulierung an der Entstehung diverser Krankheiten von Krebs bis pulmonaler Fibrose beteiligt ist [231]. Genauer wird der Mechanismus der Regulierung in dem Unterpunkt „kanonischer Wnt-Signalweg“ besprochen.

f) Intrazelluläre nachgeschaltete Signalwege

Kanonischer Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signaltransduktionsweg spielt eine wichtige Rolle in der Embryogenese [232] und seine Deregulierung kann die Karzinogenese einiger Krebsarten wie dem Kolonkarzinom entscheidend begünstigen [233-235].

Wnt ist ein Signalprotein, welches an den Transmembranrezeptor Frizzled (Fz) aus der Frizzled-Familie [236] sowie das low-density lipoprotein receptor-related protein 5 und 6 [237, 238] an der Oberfläche von Zellen bindet [239]. Daraufhin wird das intrazelluläre Protein Dishevelled (Dsh) aktiviert [240], welches wiederum den Proteinkomplex bestehend aus aktiver GSK3 α/β , Tumorsuppressor-Protein APC, CK1 und Axin-1 [228, 241, 242] [229, 230, 243, 244] hemmt [245]. Der aktive Proteinkomplex phosphoryliert β -Catenin und ubiquitiniert es somit für dessen proteolytischen Abbau [228, 246], weshalb eine Hemmung des Proteinkomplexes zu einer β -Catenin-Akkumulation in der Zelle führt. Eine aktive GSK3 führt folglich zu einem Abbau von β -Catenin in der Zelle.

β -Catenin wandert aus dem Zytosol in den Zellkern und bindet dort als Co-Aktivator an die Transkriptionsfaktoren T-cell factor/Lymphoid enhancer factor-1 [247, 248] und aktiviert die spezifischen Zielgene [249] von u.a. Cyclin D1 [250, 251] oder Myc [252, 253].

Eine schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Signalweges ist in Abbildung 3 dargestellt.

NOTCH

NOTCH ist ein Transmembran-Rezeptor, der Teil eines stark konservierten Signaltransduktionsweges ist und eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung,

Apoptose, Zellproliferation und -differenzierung spielt [253, 254]. In Zusammenhang mit der Karzinogenese einer Zelle kann NOTCH je nach Zelltyp onkogen oder tumorsuppressiv wirken [255, 256], auf die Rolle von NOTCH bei NET wird in der Diskussion genauer eingegangen.

Der NOTCH-Signalweg kann ausschließlich über Zell-Zell-Kontakt ausgelöst werden, beim Säugetier sind die vier NOTCH-Rezeptoren NOTCH 1 – 4 [257] [258] [259] [260] bekannt. Sie bestehen aus einer Transmembrandomäne (TM) und einer großen Extrazellulärdomäne (NECD), welche nach Bindung eines membranständigen Liganden einer anderen Zelle voneinander dissoziieren [261]. Es sind die fünf Liganden Delta-like 1 [261], 3 [262], 4 [263] und Jagged 1 [264], 2 [265] bekannt.

Nach Spaltung der Transmembrandomäne von der NECD wird der intrazelluläre Teil der Transmembrandomäne (NICD) proteolytisch durch β -Sekretase katalysiert abgespalten [266]. NICD wandert daraufhin in den Nukleus, bindet an den DNA-bindenden Proteinkomplex C-promoter-binding-factor/Suppressor-of-Hairless/Lag-1-Transkriptionsfaktor [267, 268] und aktiviert dort die Gene hairy and enhancer of split-1 (Hes-1) [269, 270] und c-Myc [271, 272], ebenso wie die Transkription von Cyclin D1 [273], Survivin [274] und p21^{Cip1} [275, 276].

Hes-1 kodiert für den Transkriptionsfaktor HES-1 [277], der die Transkription von u.a. achaete-scute homolog 1 (ASCL1) [278], p21^{Cip1} [279] und p27^{Kip1} [280] im Nukleus hemmt. ASCL1 ist wiederum ein Transkriptionsfaktor, dessen Vorkommen eng mit der Expression von CgA assoziiert ist [281, 282].

Survivin ist ein antiapoptotisch wirkendes Protein, das fast ausschließlich von Tumorzellen produziert wird und zum Überleben der Krebszellen beiträgt [283, 284]. Ungebunden ist NOTCH1 instabil und wird schnell durch Autophagie abgebaut [285] oder durch Phosphorylierung zum proteasomalen Abbau ubiquitiniert [286-288].

Die GSK3 β schützt die NICD durch direkte Phosphorylierung vor dem Abbau in Proteasomen und stabilisiert es somit [104, 289], einen Überblick über den NOTCH-Signalweg und der Rolle der GSK3 in ihm gibt Abbildung 4. Ob der Phosphorylierung durch die GSK3 β eine verminderte oder verstärkte NICD-Aktivität folgt, scheint vom Zelltyp abhängig zu sein.

Die Signalwege Wnt, NOTCH1 und NF- κ B regulieren sich auf vielfältige Weise gegenseitig und die Rolle der GSK3 in ihnen scheint zellspezifisch variieren zu können [290-296].

Auch gibt es Interaktionen zwischen dem PI3K/Akt/mTORC1-Signalweg und NF- κ B [297, 298] [292], wobei diese Interaktionen ebenfalls vom Zelltyp und der Mikroumgebung abhängig zu sein scheinen [299-301].

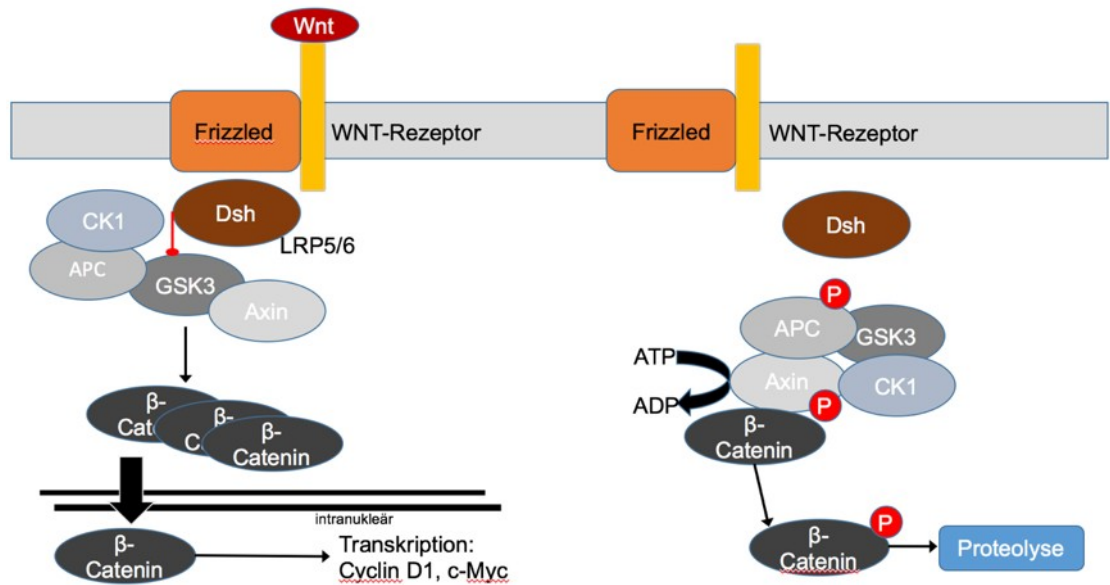


Abbildung 3: schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Weges adaptiert aus [100, 241, 248, 302]. Die Aktivierung von Wnt verhindert Dsh-vermittelt die Aktivierung des Proteinkomplexes GSK3/CK1/APC/Axin-1 [236-245]. In aktivem Zustand ubiquitiniert dieser Komplex β -Catenin und führt somit zu dessen proteolytischem Abbau [228, 246].

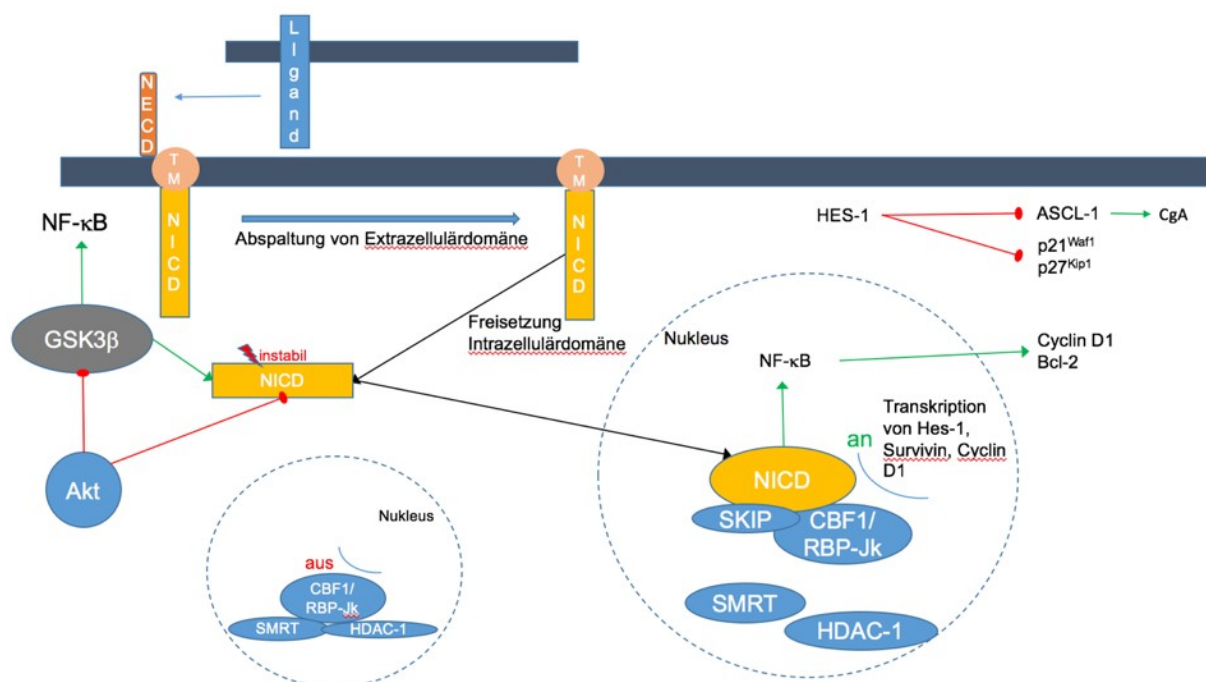


Abbildung 4: schematische Darstellung des NOTCH-Signalweges adaptiert aus [291, 294, 303, 304]. Nach Aktivierung des NOTCH-Rezeptors spaltet sich dessen Intrazellulärdomäne NICD ab, wandert in den Nukleus und bewirkt dort die Transkription von u.a. Hes-1, Survivin oder Cyclin D1 und die Aktivierung von NF- κ B [267-270, 273, 274, 290-296]. Die GSK3 β schützt die NICD durch direkte Phosphorylierung vor dem proteolytischen Abbau außerhalb des Nukleus [104, 289].

g) Glykogensynthase-Kinase 3 und Apoptose

Es wird zwischen zwei Wegen der Apoptose unterschieden: dem mitochondrialen (intrinsischen) und dem extrinsischen Weg. Im Folgenden wird nur der für die vorliegende Forschungsarbeit relevante intrinsische Weg besprochen, siehe auch Abbildung 5.

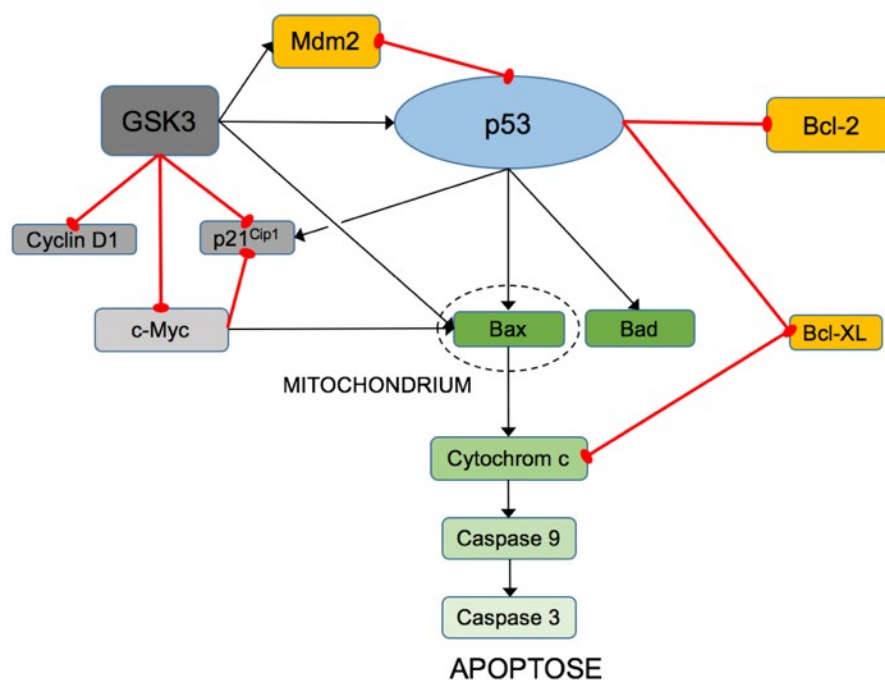


Abbildung 5: schematische Darstellung des intrinsischen Apoptoseweges sowie die Rolle der GSK3 adaptiert aus [102, 196, 202, 209, 211, 305-307]. P53 hemmt das antiapoptotische Protein Bcl-2 und aktiviert das proapoptotische Protein Bax [308-310]. Bax transloziert nach seiner Aktivierung in die Mitochondrien und bewirkt dort die Freisetzung von Cytochrom c aus der Mitochondrienmembran, woraufhin die Caspasen 9 und 3 aktiviert werden und die Zelle in Apoptose geht [310-313]. Die GSK3 β verstärkt die Aktivität von p53 und dessen Transport zu den Mitochondrien, zudem aktiviert die GSK3 β Bax [209, 306, 322-326].

Um die Apoptose einer Zelle über den intrinsischen Weg auszulösen, hemmt p53 zunächst das antiapoptotische Protein Bcl-2 [308] und aktiviert gleichzeitig das proapoptotische Protein Bax [309, 310]. Nach der Translokation von Bax aus dem Zytosol in die Mitochondrien [311] induziert dieses die Cytochrom c-Freisetzung aus der Mitochondrienmembran in das Zytosol [312], woraufhin es zu einer Aktivierung der Caspase 9 kommt [313]. Dies bewirkt die Aktivierung der Caspase 3 [313] und die Zelle geht in Apoptose [310].

P53 kann aber auch direkt an der äußeren Mitochondrienmembran durch Bildung eines Komplexes mit Bcl-XL und Bcl-2 die Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma induzieren [314-316].

P53 ist eines der wichtigsten tumorsuppressiven Proteine des Körpers und in ca. 50 % aller menschlichen Tumoren mutiert [317, 318]. P53 ist ein Transkriptionsfaktor, der zum einen die Transkription von Zielgenen von p21^{Cip1} [205], Mdm2 oder Bax aktiviert [319], aber auch in der Lage ist eine *transkriptionsunabhängige* Apoptose über den mitochondrialen Apoptoseweg auszulösen [315, 320, 321].

Die Aktivierung von p53 führt jedoch nicht zwangsläufig zu einer Apoptose der Zelle, sie kann auch nur einen Zellzyklusarrest bewirken. Die genauen Mechanismen der p53-Aktivierung sind noch nicht vollständig verstanden.

Die GSK3 hat über mehrere Wege Einfluss auf p53 und die Apoptose einer Zelle. Auf der einen Seite wirkt sie proapoptotisch

- 1) Die GSK3 β verstärkt die (transkriptionale) Aktivität von p53 im Nukleus [306, 322-325].
- 2) die GSK3 β aktiviert Bax und verstärkt dessen Transport in die Mitochondrien [209].

- 3) Die GSK3 verstärkt den Transport von p53 zu den Mitochondrien [326].
- 4) Die GSK3 inhibiert antiapoptotische Transkriptionsfaktoren wie heat shock factor-1 [92, 327].
- 5) Die GSK3 aktiviert Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (s. „Effektorproteine“) [104].

Auf der anderen Seite kann sie auch antiapoptotisch wirken

- 1) Die GSK3 kann Mdm2 durch Phosphorylierung aktivieren, was zu einer Hemmung von p53 durch Mdm2 führt [211].
- 2) Die GSK3 hemmt wie bereits in „PI3K/Akt/mTORC1-Signalweg“ erwähnt über einen negativen Rückkopplungsmechanismus den zellproliferativ wirkenden PI3K/Akt/mTORC1-Signalweg [196].
- 3) Die GSK3 hemmt β -Catenin über den Wnt-Signalweg (s. „kanonischer Wnt-Signalweg“) [229].
- 4) Die GSK3 hemmt eIF2B (s. „Effektorproteine“) [89, 328].

2) Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Für NEN im fortgeschrittenen inoperablen Stadium gibt es keinen kurativen Therapieansatz und auch die palliativen Therapieansätze sind begrenzt, weshalb die Notwendigkeit für neue Behandlungsstrategien besteht [38, 329, 330].

In meinem Projekt untersuche ich den Effekt des spezifischen GSK3-Inhibitors AR-A014418 auf die humanen NET-Tumorzelllinien BON1, QGP1, H727 und GOT1 in Bezug auf Zellproliferation, Apoptose, Zellzyklus, Migration, intrazelluläre Signalwege und ausgewählte Effektorproteine der GSK3. BON1 und QGP1 sind hierbei pankreatische NET-Zellen, H727 ist eine bronchopulmonale Zelllinie und GOT1 ist eine Mitteldarmkarzinoidzelllinie [1].

In den neuroendokrinen Tumorzelllinien von Neuroblastomen [125, 331] und medullären Schilddrüsenkarzinomen [124] ebenso wie in anderen Tumorentitäten [117, 120, 332-335] zeigte sich bereits das tumorsuppressive Potenzial einer GSK3-Hemmung.

Besonderes Augenmerk wird auf den Signalweg PI3K/Akt/mTORC1 gelegt, da dieser in Zusammenhang mit der Tumorgenese von NET gebracht wird und eng mit der GSK3-Regulierung verknüpft ist. Auch werden die Effekte einer GSK3-Hemmung auf den relevanten Signalweg Raf-1/MEK/ERK untersucht.

Durch Bestimmung der GSK3-Effektorproteine wie β -Catenin, Cyclin D1, p21^{Cip1}, Akt oder p53 soll versucht werden, den genaueren Mechanismus einer onkogenen Wirkung der GSK3 auf NET zu verstehen [1].

Des Weiteren werden Kombinationsbehandlungen mit den in der NET-Therapie bereits angewandten Substanzen Everolimus und 5-FU auf mögliche synergistische Effekte untersucht [1].

Auch der Effekt einer Kombination von AR-A014418 mit dem Statin Lovastatin, das zur Hemmung von Epidermal Growth Factor-Rezeptor (EGFR), Akt und ERK [336-338] führen kann, wird geprüft [1].

Zudem wird eine Bestrahlung der Zellen nach Behandlung mit AR-A014418 durchgeführt, da ein Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit einer Bestrahlung und GSK3 beschrieben wurde [115, 339, 340] und mögliche Konsequenzen für zukünftige Therapien untersucht werden sollen [1].

3) Material und Methoden

3.1) Material

Chemikalien und Reagenzien

Artikel	Artikelnummer	Hersteller	Herstellerstandort
5-FU	S1209	Selleckchem	München, Deutschland
6-Aminohexansäure (6-Aminocaproic acid)	A7824	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Accutase® Solution	A6964	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Albumin Solution 35 % in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS)	A7979	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Ammoniumpersulfat	A-4915	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Amphotericin B	A2612	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/-7 Assay (Caspase Substrate und Homogeneous Caspase-3/-7 Buffer)	G778A	Promega Corporation	Madison, WI, USA
Apo-Transferrin human	T1147	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
AR-A014418	A3230	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	170-6404	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Bromphenolblau	8122	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
CellTiter-Blue® Cell Viability	G8081	Promega Corporation	WI, USA
Color Protein Standard, Broad Range	P7712S	New England Biolabs GmbH	Frankfurt a. M., Deutschland
DL-Dithiothreitol (DDT)	D9779	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)/F12-Medium (1:1)	11320-074	gibco®/Life Technologies T M	Carlsbad, CA, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	D2650	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Dulbeccos PBS	D8537	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Ethanol 70 %/80 %	A0565	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Everolimus	S1120	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Fetales Kälberserum (FKS)	S0115	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Glycerol 85 %	104.094	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Glycin	1.313.401.211	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
HALT™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x)	1861282	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Insuman® Rapid 40 I.E./ml	4F061A	Sanofi-Aventis	Paris, Frankreich
Lovastatin	M2147	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA

Mammalian-Protein Extraction Reagent (M-PER™ Lysisbuffer)	78501	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Methanol Rotisolv® HPLC	P717.1	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Methylenblau 0,3 %	A4084	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	106.688	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	106.404	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	15140-122	gibco®/Life TechnologiesTM	Karlsruhe, Deutschland
Propidiumiodid	81845	Fluka Holding AG	St. Gallen, Schweiz
Roti®-Quant Universal Kit	0120.2	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® 10x SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	3060.2	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 (30 % Acrylamid)	3029.1	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640-Medium	R8758	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
SDS (Natriumdodecylsulfat)	161-0302	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
SuperSignal® ELISA femto Stable Peroxide Solution and femto Luminol/Enhancer Solution	1856194; 1856193	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	2367.3	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) Trizma® hydrochloride	T5941	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Trypan Blue stain 0,4%	T10282	invitrogen TM	Carlsbad, CA, USA
Trypsin/ Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Solution (10x)	L2153	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Tween® 20	P1379	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA

Tabelle 3: Auflistung aller verwendeter Chemikalien und Reagenzien

Verbrauchsmaterialien und Laborzubehör

Artikel	Nummer	Hersteller	Herstellersitz
combitips advanced® 0,5 ml; 25 ml	0030089.421; 0030089.472	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Countess™ Cell Counting Chamber Slides	C10283	invitrogen™	Karlsruhe, Deutschland
Kryoröhrchen	368632	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Pipettenspitzen TipOne® 10µl; 200 µl; 1000 µl	S1120-8310; S1120-8810; S1126-7810	starlab GmbH	Ahrensburg, Deutschland
Serological Pipet 5 ml; 10 ml; 25 ml	0030127714; 0030127722; 0030127730	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Zellschaber 25 cm, Klinge 17 mm	831.830	Sarstedt AG	Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml; 50 ml	352096; 352070	Falcon® Corning Science	Tamaulipas, Mexiko

Tabelle 4: Auflistung aller verwendeter Verbrauchsmaterialien und Laborzubehör

Geräte

	Gerätetyp	Hersteller	Herstellerstandort
Brutschrank	CO2-Auto Zero	Heraeus GmbH	Hanau, Deutschland
Chemolumineszenz-Aufnahmegerät	ECL ChemoCam Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH	Göttingen, Deutschland
Durchflusszytometer	BD Accuri C6	BD Biosciences (Becton-Dickinson)	Heidelberg, Deutschland
Elektrophoresekammer	Protean® II xi Cell	BIO-RAD Laboratories GmbH	München, Deutschland
Kamera Zellmigration	AxioCam MRm	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Zellmigration	Axiovert 135 TV	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Mikrozentrifuge Millipore	MC-13	Amicon Bioseparations Inc.	MA, USA
Orbital Shaker	OS-20	Biosan Ltd.	Riga, Lettland
Photometer	Sunrise TM	Tecan Group Ltd.	Männerdorf, Schweiz
Röntgenbestrahler	RS-225	xStrahl	Camberley, UK
Semi-Dry-Elektroblotter Sedec™	Perfect Blue™	VWR Peqlab	Darmstadt, Deutschland
Shaker	DRS-12	NeoLab Migge GmbH	Heidelberg, Deutschland
Sterilwerkbank	LaminAir	Heraeus GmbH	Hanau, Deutschland
Wärmeblock	BTD	Grant Instruments	Cambridge, UK
Wärmeschrank	U 25	memmert	Schwabach, Deutschland
Zellzähler	Countess™ automated cell counter	invitrogen™	Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge	Universal 320 R	Andreas Hettich GmbH & Co KG	Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 5: Auflistung aller verwendeter Geräte

Primäre Antikörper

	Nummer	Hersteller	Herstellerstandort
Anti-4EBP1	#9644	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Anti-Akt	#2920	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Anti-Bcl-2	610539	Transduction Laboratories	New Jersey, USA
Anti-Chk1	#2360	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Anti-Cyclin D1	#2926	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Anti-Cyclin D3	#2936	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Anti-EGFR	#4267	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Anti-Erk 1/2	#06-182	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
Anti-GSK3 α/β	#5676	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Anti-IGF1-R	#3027	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Anti-LC3A	#4599	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Anti-p27Kip1	#3686	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Anti-p4EBP1 (Ser65)	#9451	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Anti-p53	sc-126	Santa Cruz Biotechnologie Inc.	Heidelberg, Deutschland
Anti-p70S6K	#2708	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Anti-pAkt (Ser 473)	#4060	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Anti-pChk1 (Ser345)	#2348	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Anti-pEGFR (Tyr1068)	#3777	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Anti-pERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	#4370	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Anti-pGSK3 α/β (Ser21/9)	#9331	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Anti-pp70S6K (Thr389)	#9205	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Anti-pS6 (Ser204/4)	#5364	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
pCip1	610233	BD Transduction Laboratories	Franklin Lakes, NJ, USA
Anti-S6	#2217	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Anti- β -Actin (A5441 Sigma)	#A5441	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Anti- β -Catenin	#8480	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA

Tabelle 6: Auflistung aller verwendeter primärer Antikörper [1]

Sekundäre Antikörper

		Hersteller	
Meerrettich Peroxidase konjugierter Zweitantikörper	#7074	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA

– Kaninchen			
Meerrettich Peroxidase konjugierter Zweitantikörper – Maus	#707 6	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA

Tabelle 7: Auflistung aller verwendeter sekundärer Antikörper [1]

3.2) Methoden

Zellkultur

Die humanen neuroendokrinen Zellen des Pankreas BON1 [341] wurden uns freundlicherweise von Prof. R. Göke (Marburg, Deutschland) überlassen.

Die humanen pankreatischen Inselzellen QGP1 [342] wurden von der Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (JCRB Cell Bank) bezogen.

Die humanen bronchopulmonalen neuroendokrinen Zellen NCI-H727 (H727) [343] wurden von ATCC (Manassas, VA, USA) käuflich erworben.

Die humanen Mitteldarmkarzinoidzellen GOT1 [344] wurden uns freundlicherweise von Prof. O. Nilsson (Sahlgrenska University Hospital Göteborg, Schweden) zur Verfügung gestellt.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden vom Leibniz Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) mit Hilfe von Mikrosatelliten untersucht und authentifiziert [1].

Alle vier Zelllinien wurden in 175 cm² Zellkulturflaschen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % in dem Begasungsbrutschrank CO₂-AutoZero (Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland) kultiviert. Im Folgenden wurden alle Inkubationen, wenn nicht anders erwähnt, bei 37 °C in diesem Begasungsbrutschrank unter genannten Bedingungen durchgeführt.

Für BON1- und QGP1-Zellen wurde das Medium DMEM/F12-Medium (1:1) (gibco®/Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) verwendet, welches mit 10 % FKS (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland), 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco®/Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) und 0,4 % Amphotericin B (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) versetzt wurde [1].

Für H727-Zellen wurde das Medium RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) verwendet, welches ebenfalls mit 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco BRL) und 0,4% Amphotericin B (Biochrom KG) versetzt wurde [1].

Für die GOT1-Zellen wurde das Medium RPMI 1640 verwendet, welches ebenfalls mit 10 % FKS, 1 % Penicillin / Streptomycin und 0,4 % Amphotericin B versetzt wurde, zusätzlich wurden hier noch 0,135 I.E./ml Insulin Insuman® Rapid 40 I.E./ml (Sanofi-Aventis, Paris, Frankreich) und 5 mg/ml Apo-Transferrin human (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) hinzugefügt [1].

Im Nachfolgenden ist unter Medium immer das der Zelllinie entsprechende und mit Kälberserum, Antibiotika und Antimykotikum, bzw. zusätzlichem Insulin und ApoTransferrin, versetzte Medium gemeint.

Alle Arbeiten mit den Zellkulturen wurden unter der Sterilwerkbank LaminAir (Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland) getätigt, um Kontaminationen zu vermeiden.

Splitten

BON1-, QGP1- und H727-Zellen

Die Zellen wurden zwei Mal in der Woche gesplittet, wenn die Flaschen zu 90 % - 100 % voll waren. Die Splittingverhältnisse wurden an die unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der Zellen angepasst. BON1-Zellen wurden in einem Verhältnis von bis zu 1:10, QGP1-Zellen in einem Verhältnis von bis zu 1:3 und H727-Zellen in einem Verhältnis von bis zu 1:4 gesplittet.

Nach Absaugen des verbrauchten Mediums in den Flaschen wurden die Zellen mit 6 ml PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gewaschen, um den Trypsinblocker FKS wegzuspülen. Nach Absaugen des PBS wurde den Flaschen je 3 ml 1x Trypsin/EDTA Solution ((10x) (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland), mit PBS auf 1x Solution verdünnt) zugesetzt und 3 min – 5 min im Brutschrank inkubiert, so dass die Zellen sich von dem Flaschenboden lösten. Nach Resuspendierung mit ca. 6 ml Medium zur Inaktivierung des Trypsins wurden die Zellen in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon® Corning Science, Tamaulipas, Mexiko) überführt und 10 min bei 1.250 U/min und 25 °C in der Zentrifuge Universal 320 R (Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert.

Das Medium-Trypsin-Gemisch wurde abgesaugt und das sich am Boden abgesetzte Pellet wurde mit 10 ml – 12 ml Medium gründlich resuspendiert. Je nach gewünschtem Splittingverhältnis wurde die entsprechende Menge an Zellsuspension in die 175 cm²-Flaschen zurückgegeben und mit Medium auf 20 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Das restliche Zellgemisch wurde zum Aussäen der Versuche verwendet.

Die Flaschen wurden nach maximal fünfmaligem Splitten ausgetauscht, alle Zelllinien wurden höchstens bis Passage 35 verwendet.

GOT1-Zellen

GOT1-Zellen stellten aufgrund ihrer sehr langsamen Wachstumsgeschwindigkeit eine Ausnahme dar, sie konnten nur alle 4 – 6 Wochen in einem Verhältnis von 1:2 gesplittet werden.

Beim Splitten wurde anstelle von Trypsin Accutase® Solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) verwendet und anschließend für 60 min im Brutschrank inkubiert.

Bei Erhalt der GOT1-Zellen waren diese bereits Passage 60, weshalb wir GOT1-Zellen bis Passage 95 verwendeten.

Einfrieren

Alle vier Zelllinien wurden in einem Einfriermedium bestehend aus 90 % FKS und 10 % DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suspendiert. Das DMSO verhinderte hierbei die Schädigung der Zellen durch die Kälte. Je 1 ml des Einfriermedium-Zellen-Gemisches wurde in ein Kryoröhrchen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gegeben und zunächst bei -80 °C im Kühlsystem HFC 486 basic Ultrafreezer (Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland) gelagert und anschließend in einen Stickstofftank überführt.

Auftauen

Zum Auftauen wurden die Zellen in etwa 30 ml Medium in 100 mm x 20 mm -Zellkulturplatten (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) so schnell wie möglich resuspendiert, um die Zellschädigung, die durch DMSO in flüssigem Zustand verursacht wird, zu minimieren. Die Platten wurden im Brutschrank bei 37 °C kultiviert bis sie 90 % – 100 % zugewachsen waren und dann in 175 cm²-Zellkulturflaschen gesplittet.

Inhibitoren

Der GSK3-Inhibitor AR-A014418, Lovastatin und Everolimus wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) erworben, 5-FU wurde über Selleckchem (München, Deutschland) bezogen [1].

AR-A014418 und Everolimus wurden in purem DMSO in einem 20 mM Stock gelöst, Lovastatin und 5-FU wurden in purem DMSO in einem 10 mM Stock gelöst.

Alle in DMSO gelösten Substanzen wurden bei -20 °C im Kühlsystem GNP2713 Comfort (Liebherr International AG, Bulle, Schweiz) aufbewahrt.

AR-A014418

AR-A014418 ist ein Adenosintriphosphat (ATP)-kompetitiver, spezifischer GSK3-Inhibitor [345]. ATP-spezifische Inhibitoren besetzen die ATP-Bindungsstelle von

GSK3, wobei AR-A014418 die zwei Isoformen GSK3 α und GSK3 β mit gleicher Potenz hemmt [345, 346]. AR-A014418 wurde bereits an diversen Tumorzelllinien [117, 125, 332, 347] sowie bei Mäusen *in vivo* mit 30 μ mol/kg intraperitoneal bzw. 0,1 – 1 mg/kg intraperitoneal [348-350] getestet [1].

Dosisfindung

Die in der Arbeit untersuchten Konzentrationen von AR-A014418 wurden durch Vorversuche mit einem Wirkungsbereich von AR-A014418 ≥ 5 μ M bestimmt [1]. Die gefundenen Wirkungsbereiche entsprechen denen anderer Arbeitsgruppen in u.a. Glioblastomzellen [351], Endometriumkarzinomzellen und humanen Pankreaskarzinomzellen [117, 352].

Lovastatin wurde mit therapeutisch relevanter Konzentration von 10 μ M getestet entsprechend bereits veröffentlichter Ergebnisse [1][336, 338].

Everolimus wurde mit einer Konzentration von 10 nM getestet entsprechend bereits veröffentlichter Ergebnisse [1][338, 353].

5-FU wurde mit einer Konzentration von 5 μ M getestet entsprechend kürzlich veröffentlichter Ergebnisse [1][354, 355].

Zellproliferationsassay

Die Zellzahl wurde mit Hilfe des Zellzählers Countess™ automated cell counter (invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland) bestimmt. Hierbei wurden die Zellen gemäß Herstellerangaben mit Trypan Blue stain 0,4 % (invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland) angefärbt, so dass der Zellzähler vitale von toten Zellen unterscheiden konnte [1]. Die Zellzahl wurde bei allen in dieser Arbeit im Folgenden beschriebenen Experimenten auf diese Weise ausgezählt.

Alle Zelllinien wurden auf 96-Well Zellkulturplatten (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) ausgesät. Es wurden 1.500 BON1-Zellen/Well, 2.000 QGP1-Zellen/Well, 2000 H727-Zellen/Well und 30.000 GOT1-Zellen/Well in 100 μ l Medium/Well ausgesät. Die unterschiedlichen Zellzahlen berücksichtigten die Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie [1].

Die Zellen wurden nach dem Aussäen 24 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit konnten die Zellen anwachsen und sich vermehren.

Nach Ablauf der 24 h wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit AR-A014418 alleine oder AR-A014418 in Kombination mit Lovastatin, Everolimus oder 5-FU stimuliert. Die Vorverdünnungen der Substanzen wurden mit 0,2 % FKS/

PBS hergestellt, diese wurden dann in Medium auf die Endkonzentrationen verdünnt [1].

AR-A014418 alleine wurde mit Konzentrationen von 5 μM bis 100 μM getestet [1].

In Kombination mit 10 μM Lovastatin wurde AR-A014418 mit Konzentrationen von 2,5 μM bis 20 μM getestet [1].

In Kombination mit 5 μM 5-FU wurde AR-A014418 ebenfalls mit Konzentrationen von 2,5 μM bis 20 μM getestet [1].

Mit 10 nM Everolimus wurde AR-A014418 mit Konzentrationen von 0,625 μM bis 20 μM kombiniert [1].

Das Zellüberleben wurde bei Behandlung mit AR-A014418 alleine und bei allen Kombinationsbehandlungen nach 72 h und 144 h Inkubation gemessen.

Es wurde immer eine DMSO-Kontrolle der höchsten Konzentration, eine Kontrolle mit Medium sowie ein Leerwert nur mit Medium ausgesät. Jedes Experiment wurde mindestens drei Mal wiederholt.

Nach 72 h bzw. 144 h wurden 20 μl CellTiter-Blue® des Cell Viability Assays (Promega, Madison, WI, USA) gemäß Herstellerangaben in jedes Well pipettiert und 4 h inkubiert. Die metabolische Zellaktivität wurde anhand der Fluoreszenz bei 525 nm Extinktion und 580 – 640 nm Emission mit dem Photometer GloMax® Multi Detection System (Promega, Madison, WI, USA) bestimmt [1].

Western Blot

Es wurden Western Blot-Analysen zur Bestimmung der Substanzwirkung auf Proteinebene durchführt.

Es wurden entsprechend ihrer Zellwachstumsgeschwindigkeit 300.000 BON1-Zellen bzw. 400.000 QGP1- oder H727-Zellen in jedes Well auf 6-Well-Zellkulturplatten in 4 ml Medium ausgesät und über Nacht zum Anwachsen der Zellen bei 37 °C inkubiert. Im Falle der GOT1-Zellen wurden 500.000 Zellen pro Well auf 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und ca. 2 Wochen bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h bzw. 2 Wochen wurde das Medium gewechselt und mit AR-A014418 in Konzentrationen von 5 μM bis 20 μM alleine für 2 h oder 48 h oder zunächst für 72 h mit 10 μM Lovastatin und dann für 2 h zusätzlich mit AR-A014418 in Konzentrationen von 10 μM , 15 μM oder 20 μM versetzt. Die Vorverdünnungen der Substanzen wurden mit 0,2 % FKS/PBS hergestellt. Es wurden jedes Mal eine DMSO-Kontrolle und bei den Kombinationsbehandlungen Kontrollen der Konzentrationen der Einzelsubstanzen ausgesät und jedes Experiment mindestens drei Mal wiederholt [1].

Nach Inkubation mit den Substanzen wurde das Medium abgesaugt, die Platten zweimalig mit etwa 2 ml PBS auf Eis gewaschen und anschließend mit 200 μl

Lysispuffer versetzt (s. Tabelle 8). Die Platten wurden bei -40 °C bis zu ihrer Aufbereitung eingefroren. Die Zusammensetzung aller auch im Folgenden erwähnten Puffer kann Tabelle 8 entnommen werden.

Proteinbestimmung

Das aufgetaute Zelllysate wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt und bei 13.000 Umdrehungen (U)/min für 10 min in der Mikrozentrifuge Millipore MC-13 zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und die Proteinbestimmung mit der Roti®-Quant universal colorimetric protein concentration analysis (Roti®-Quant Universal Kit, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Extinktionen wurden mit Hilfe des Photometers Sunrise™ (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bei 492 nm gemessen, hierbei wurde die Standardkurve mit M-PER™ Lysispuffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) seriell verdünnt.

Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration durch entsprechende Zugabe von M-PER™ Lysispuffer auf eine Zielkonzentration von 30 µg – 50 µg/50 µl eingestellt [1]. Nach Zugabe von mit 20 mg/ml DDT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) versetztem SDS-Probenpuffer (s. Tabelle 8) im Verhältnis 1:4 wurden die Proben zur Proteindenaturierung bei 95 °C für 5 min in dem Wärmeblock BTD (Grant Instruments, Cambridge, UK) erhitzt [1].

Puffer	Zusammensetzung
Lysispuffer	M-PER™ + HALT™ = 1000:10
SDS-Probenpuffer	10 ml Gelpuffer + 2 g SDS + 40 ml 85 % Glycerin + 0,05 % Bromphenolblau und auf 100 ml mit destilliertem Wasser (dest) auffüllen
Tris-buffered saline (TBS)-Pufferlösung	0,05 M Tris-Hydrochlorid (HCl) + 0,15 M NaCl + 0,01 % NaN ₃ auf 1000 ml auffüllen pH 8
Blocking Solution	0,05 M Tris-HCl + 0,15 M NaCl + 0,01 % NaN ₃ + 20 g N- Methylformamid (= 2 %) + auf 1000 ml auffüllen pH 8
TBS with Tween20 (TBS-T)- Waschlösung	0,05 M Tris-HCl + 0,15 M NaCl + 0,01 % NaN ₃ + 1 % Tween 20 auf 1000 ml auffüllen pH 8
Gelpuffer (4fach SDS)	0,4 g SDS + 18,8 g Tris in 100 ml mit konzentriertem HCl auf pH 8,8 einstellen
Elektrodenpuffer (Rotiphoese 10x SDS- PAGE)	6,06 g Tris + 28,8 g Glycin + 2 g SDS in 1000 ml
Semi-Dry-Anodenpuffer	36,3 g Tris + 200 ml 20 % (v / v) Methanol + dest auf 1000 ml auffüllen
Semi-Dry-Kathodenpuffer	21,6 g 6-Aminohexansäure + 0,1 g 0,01 % SDS (g/v) + 200 ml 20 % (v/v) Methanol + dest auf 1000 ml auffüllen
	2,5 ml Gelpuffer + 1 g SDS + 85 % Glycerin + Bromphenolblau

Tabelle 8: Zusammensetzung aller im Western Blot benutzten Puffer

Gelelektrophorese und Western Blot

Jeweils 50 µl der Proben wurden auf ein Gradientengel (8 % – 20 %) aufgetragen, die genaue Zusammensetzung des Gels kann Tabelle 9 entnommen werden. Zusätzlich zu den Proben wurde der gefärbte Molekulargewichtsstandard Color Protein Standard, Broad Range (New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland) aufgetragen.

Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese für 2 h bei 100 mA nach Größe aufgetrennt, die Elektrophoresekammer Protean®II xi Cell (BIO-RAD Laboratories GmbH, Göttingen, Deutschland) war hierbei mit Elektrodenpuffer (s. Tabelle 8) gefüllt. Die aufgetrennten Proteine wurden daraufhin mit Hilfe des

Semi-Dry-Elektroblotters Sedec™ (VWR Peqlab, Darmstadt, Deutschland) für 1 h bei 1 mA auf die Polyvinylidenfluorid-Membran Immobilon®-P (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) transferiert und somit fixiert. Zur Verbesserung der Stromleitfähigkeit wurde die Membran zwischen jeweils ein in Anodenpuffer (s. Tabelle 8) und ein in Kathodenpuffer (s. Tabelle 8) getränktes Gel Blotting Paper GB 005 (Whatman™, Buckinghamshire, UK) gelegt [1].

	Sammelgel	Gradientengel	
	4,0 %	8 %	20 %
Acrylamid 30 %	2,9 ml	8,6 ml	21,6 ml
Gelpuffer	5,4 ml	8,1 ml	8,1 ml
Dest/60 % Glycerin	13,4 ml (dest)	15,7 ml (dest)	2,7 ml (G)
Temed	25 µl	Je Gel 15 µl	Je Gel 15 µl
Ammoniumpersulfat 50 %		Je Gel 15 µl	Je Gel 15 µl

Tabelle 9: Gelrezept für zwei 1,5 mm-SDS-Gele

Primäre Antikörper

Die Membran wurde mehrmals in TBS-T-Waschlösung (s. Tabelle 8) gewaschen und anschließend 30 min mit der Blocking Solution (s. Tabelle 8) behandelt.

Auf die so vorbereitete Membran wurden nun die primären Antikörper (s. Tabelle 6) hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Shaker DRS-12 (NeoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland) inkubiert [1].

Sekundäre Antikörper

Die überschüssigen primären Antikörper wurden mit TBS-T-Waschlösung (Tabelle 8) von der Membran entfernt und es wurde je nach primären Antikörpern der sekundäre Antikörper Goat-Anti-Rabbit-HRP (1:25.000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) oder der sekundäre Antikörper Goat-Anti-Mouse-HRP

(1:25.000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) hinzugegeben (s. Tabelle 7). Die so behandelten Membranen wurden für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Shaker DRS-12 inkubiert [1].

Im nächsten Schritt wurden die überschüssigen sekundären Antikörper mit Hilfe von TBS-T-Waschlösung (Tabelle 8) gewaschen.

Imaging

Die gründlich gewaschenen Membranen wurden mit dem Chemolumineszenz-Reagenz SuperSignal® ELISA femto Stable Peroxide Solution and femto Luminol/Enhancer Solution (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lichtemission der Reaktion zwischen dem Chemolumineszenz und der an den sekundären Antikörper gebundenen Meerrettich-Peroxidase wurde mit Hilfe des Chemolumineszenz-Aufnahmegeräts ECL ChemoCam Imager (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) detektiert.

Zellmigration

Die Auswirkung von AR-A014418 auf die Migrationsfähigkeit der Zellen wurde mit einem Migrationsassay untersucht. Getestet wurden die Zelllinien BON1, QGP1 und H727. GOT1-Zellen haben eine Verdopplungsgeschwindigkeit von etwa drei Wochen und sind somit nicht geeignet für ein Zellmigrationsassay [1][344].

Es wurden zunächst die Culture Inserts 2-Well (ibidi GmbH, München, Deutschland) mit 500 µm breitem Steg in 6-Well-Zellkulturplatten eingeklebt.

Es wurden entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit je 120.000 BON1-Zellen, bzw. 140.000 QGP1- oder H727-Zellen/Kammer in 70 µl Medium ausgesät.

Die Platten wurden bei 37 °C im Brutschrank für 24 h inkubiert, um das Anwachsen der Zellen zu ermöglichen. Nach dem Entfernen der Inserts wurde 1 ml Medium/Well hinzugegeben und mit AR-A014418 Konzentrationen von 5 µM und 20 µM stimuliert.

Die Vorverdünnungen wurden mit 0,2 % FKS/PBS hergestellt und es wurden DMSO-Kontrollen der höchsten Konzentration ausgesät.

Es wurden jeweils zweifach Werte genommen und jedes Experiment mindestens drei Mal wiederholt.

Nach 0 h und 48 h wurden Fotos der Spaltfläche mit Hilfe des Mikroskops Axiovert 135 TV (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) und der Kamera AxioCam MRm (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen.

Die Vermessung der Spaltflächen erfolgte mit dem Programm ImageJ (Version 1.38x, WI, USA) [1].

Bestrahlung und Kolonieinformationsassay

Die Zelllinien BON1, QGP1 und H727 wurden nach Behandlung mit AR-A014418 bestrahlt, um mögliche radiosensibilisierende Effekte auf die Tumorzellen zu untersuchen [115]. Mit GOT1-Zellen konnte das Experiment aufgrund fehlender Kolonienbildung, bedingt durch ihre zu lange Verdopplungszeit, nicht durchgeführt werden [1][344].

Zunächst wurden die Zellen, wie unter „Splitten“ (s. Anhang) beschrieben, aus den Zellkulturflaschen gelöst und ausgezählt. Daraufhin wurden die Zellsuspensionen (s. Anhang Tabelle 1) in Medium hergestellt und 6-Well-Zellkulturplatten mit 2 ml/Well Medium vorbereitet. In die vorbereiteten Platten wurde die entsprechende Menge der Zellsuspension hinzugegeben, um 200 – 400.000 BON1- bzw. QGP1-Zellen/Well und 300 – 400.000 H727-Zellen/Well für die Behandlung mit AR-A014418 zu erhalten (s. Anhang Tabelle). Für die DMSO-Kontrolle wurden 200 – 200.000 Zellen/Well für alle drei Zelllinien ausgesät (s. Anhang Tabelle 1). In der Kontrolle wurde eine geringere Zellkonzentration ausgesät, da sich in Vorversuchen durch das starke Wachstum ohne Inhibitor ein Ablösen der Zellen bei mehr als 200.000 Zellen/Well zeigte.

Die Platten wurden anschließend für 4 h bei 37 °C inkubiert, um das Anwachsen der Zellen zu ermöglichen. Daraufhin wurde das Medium abgesaugt und mit 2 ml frischem Medium ersetzt, welchem AR-A014418 oder DMSO in Konzentrationen von 1 µM bzw. 2 µM zugesetzt wurde. Die Vorverdünnungen wurden in Medium hergestellt und die stimulierten Platten für 1 h inkubiert [1].

Nun wurden die Platten mit γ -Strahlung von 0 bis 10 Gy in dem Röntgenbestrahler RS-225 (200 kV und 10 mM, Thoraesus Filter, 1 Gy in 1 min 5 Sekunden (s); xStrahl, Camberley, UK) behandelt und anschließend für 28 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ Luftfeuchtigkeit inkubiert [1].

Die gebildeten Zellkolonien wurden nach Absaugen des Mediums mit 80 % Ethanol (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) fixiert und angefärbt. Das Ethanol wurde zuvor mit 0,3 % Methylenblau (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) versetzt.

Gruppen von 50 Zellen oder mehr wurden als Kolonie definiert und unter mikroskopisch-visueller Kontrolle ausgezählt.

Es wurden jeweils sechsfach Werte genommen und jedes Experiment drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt [1].

Durchflusszytometrie

Um die Veränderungen im Zellzyklus durch eine AR-A014418-Behandlung untersuchen zu können, wurde eine Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) durchgeführt. Es wurde der Effekt von AR-A014418 alleine auf die Zelllinien BON1, QGP1, H727 und GOT1 untersucht. Die Kombination von AR-A014418 und Lovastatin wurde in BON1-, QGP1- und H727-Zellen getestet und in QGP1-Zellen wurde zudem die Kombination von AR-A014418 mit 5-FU getestet [1].

Zunächst wurden 300.000 Zellen/Well auf 6-Well-Zellkulturplatten (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) ausgesät und bei 37 °C im Brutschrank für 24 h inkubiert, um das Anwachsen der Zellen zu ermöglichen. Daraufhin wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und mit 1 ml frischem Medium ersetzt. Diesem wurde AR-A014418 alleine oder AR-A014418 in Kombination mit Lovastatin oder Everolimus hinzugefügt. Die Vorverdünnungen der Substanzen wurden mit 0,2 % FKS/PBS hergestellt.

AR-A014418 alleine wurde mit Konzentrationen von 5 µM bis 60 µM getestet. In Kombination wurden 10 µM Lovastatin mit 20 µM AR-A014418 und 5 µM 5-FU mit 20 µM AR-A014418 getestet. Es wurde immer eine DMSO-Kontrolle der höchsten Konzentration ausgeführt [1]. Für jede Probe wurden 20.000 Ereignisse gemessen. Es wurden jeweils zweifach Werte genommen und jedes Experiment mindestens drei Mal wiederholt [1].

Die Durchflusszytometrie wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers BD Accuri C6 (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) und dem Protokoll „Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry“ (Riccardi C, Nicoletti I: Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. Nature protocols 2006;1:1458-1461) folgend durchgeführt [1]. Die mit den Substanzen stimulierten Proben wurden 48 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und nach 48 h für die Durchflusszytometrie aufbereitet. Hierfür wurde zunächst das Medium jeden Wells in nummerierte 2 ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) überführt.

Um den Trypsinblocker FKS zu entfernen, wurden die Wells mit je 500 µl PBS gewaschen und dieses ebenfalls in die entsprechenden Reaktionsgefäße pipettiert. Nun wurden 300 µl Trypsin/Well hinzugefügt und die Platten bei 37 °C für 5 min im Wärmeschrank U25 (Mettler, Schwabach, Deutschland) inkubiert, um die am Wellboden haftenden Zellen zu lösen.

Das Trypsin-Zellgemisch wurde mit dem bereits abpipettiertem Medium aus den jeweiligen Reaktionsgefäßen resuspendiert, durchmischt und zurück in die

Reaktionsgefäße überführt. Das Trypsin wurde hierdurch geblockt und nun befanden sich alle Zellen aus den Wells in den jeweiligen Reaktionsgefäßen.

Im nächsten Schritt wurde das verbrauchte Medium, das PBS und das Trypsin aus den Proben entfernt, indem die Reaktionsgefäße mit 2.000 U/min für 5 min mit der Mikrozentrifuge Millipore MC-13 (Amicon Bioseparations Inc., MA, USA) zentrifugiert und anschließend der Überstand abpipettiert wurde. Die gebildeten Zellpellets wurden mit 1 ml PBS resuspendiert und zum Waschen kurz gevortext. Nach nochmaligem Zentrifugieren mit 2.000 U/min für 5 min wurde der Überstand abermals abpipettiert. Nach Zugabe von 300 µl Propidiumiodid-Lösung (Fluka Holding AG, St. Gallen, Schweiz) und kurzem Vortexen zur gründlichen Durchmischung wurden die Proben lichtgeschützt bei 4 °C gelagert und innerhalb von 24 h gemessen [1].

Caspase-Assay

Um die Auswirkungen von AR-A014418 auf die Apoptose der Zellen zu untersuchen, wurde die Caspase-3 und Caspase-7-Aktivität mit Hilfe des Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/-7 Assays (Promega, Madison, WI, USA) gemessen. In den Zelllinien BON1, QGP1 und H727 wurde der Effekt von AR-A014418 alleine und von AR-A014418 in Kombination mit Lovastatin untersucht. In QGP1-Zellen wurde zudem die Kombination AR-A014418 plus 5-FU getestet, da diese Kombinationen synergistisch waren [1].

Für alle drei Zelllinien wurden jeweils 10.000 Zellen/Well auf 96-Well-Assay-Platten (Corning Inc., New York, NY, USA) ausgesät und zum Anwachsen der Zellen für 24 h bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit den jeweiligen Substanzen stimuliert [1].

AR-A014418 alleine wurde mit Konzentrationen von 5 µM, 10 µM und 20 µM getestet.

Die Kombinationen wurden mit Konzentrationen von 10 µM Lovastatin plus 20 µM AR-A014418 und 5 µM 5-FU plus 20 µM AR-A014418 getestet. Die Vorverdünnungen der Substanzen wurden mit 0,2 % FKS/PBS hergestellt, welche dann in Medium auf die Endkonzentration verdünnt und in die Wells pipettiert wurden.

Es wurde immer eine DMSO-Kontrolle der höchsten Konzentration ausgesät.

Es wurden jeweils zweifach Werte genommen und jedes Experiment mindestens drei Mal wiederholt.

Nach 72 h Inkubation der stimulierten Zellen wurde das Reagenz Apo-ONE® Caspase Substrate (Promega, Madison, WI, USA) im Verhältnis 1:100 dem Puffer

Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/-7 Buffer (Promega, Madison, WI, USA) entsprechend Herstellerangaben hinzugegeben und je 100 µl dieses Puffergemisches in die Wells pipettiert und lichtgeschützt ca. 90 min bis 120 min mit Hilfe des Orbital Shakers OS-20 (Biosan Ltd., Riga, Lettland) durchmischt. Die Fluoreszenz wurde bei 490 nm Extinktion und 510 – 570 nm Emission mit Hilfe des Photometers GloMax® Multi Detection System (Promega, Madison, WI, USA) gemessen [1].

Statistik

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen in den Abbildungen dargestellt.

Für die statistische Analyse von Zellproliferation, Durchflusszytometrie, Zellmigration und Caspase-Assay wurden die Ergebnisse zunächst auf ihre Normalverteilung und Varianzenhomogenität mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test bzw. dem Lavene-Test überprüft. Bei Zutreffen dieser Voraussetzungen wurde eine einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test oder ein zweiseitiger t-Test durchgeführt. Lagen keine Normalverteilung und/oder Varianzenhomogenität vor, wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen. Es wurde das Programm SPSS (Version 23 für Mac, IBM SPSS Statistics (2015), NY, USA) verwendet. Eine statistische Signifikanz von $p < 0,05$ wurde mit „*“, von $p < 0,01$ mit „**“ und von $p < 0,001$ mit „***“ in den Abbildungen gekennzeichnet. Die statistische Signifikanz wurde in Bezug auf die jeweilige DMSO-Kontrolle berechnet [1].

Für die Abbildungen der Western Blots wird ein repräsentativer Blot von mindestens drei unabhängig durchgeführten Versuchen gezeigt.

Die Quantifizierungen der Western Blots wurden mit Hilfe einer Densitometrie durchgeführt [1].

Für die statistische Analyse möglicher synergistischer oder antagonistischer Effekte bei kombinierter Gabe von AR-A014418 mit Lovastatin, Everolimus oder 5-FU in den Zellproliferationsversuchen wurde ein gemischt lineares Modell mit festen und zufälligen Effekten verwendet [1].

Die Einzelsubstanzgabe von AR-A014418, Lovastatin, Everolimus oder 5-FU, die Inkubationszeit sowie der Interaktionseffekt bei Kombinationsgabe von AR-A014418 mit einer der drei anderen Substanzen wurden hierbei als feste Effekte festgelegt. Der Versuchseffekt wurde als zufälliger Effekt berücksichtigt. Statistische Signifikanz

wurde für $p < 0,05$ angenommen. Die Berechnungen wurden mit R Version 3.3.3 für Windows (GNU General Public License; R Foundation, Wien, Österreich) durchgeführt. Ein statistisch signifikanter Synergismus wurde mit „syn“ in den Abbildungen gekennzeichnet, ein statistisch signifikanter additiver Effekt mit „add“ und ein statistisch signifikanter Antagonismus mit „ant“ [1].

4) Ergebnisse

4.1) Glykogensynthase-Kinase 3-Hemmung

In den vier untersuchten Zelllinien zeigte sich eine GSK3 α / β -Expression unterschiedlicher Ausprägung (s. Abbildung 5), so war die GSK3 α -Expression in GOT1-Zellen am stärksten, gefolgt von QGP1-Zellen (s. Abbildung 6). Die GSK3 β -Expression war in BON1-, GOT1- und QGP1-Zellen gleich stark, in H727-Zellen hingegen am schwächsten ausgeprägt (s. Abbildung 6) [1].

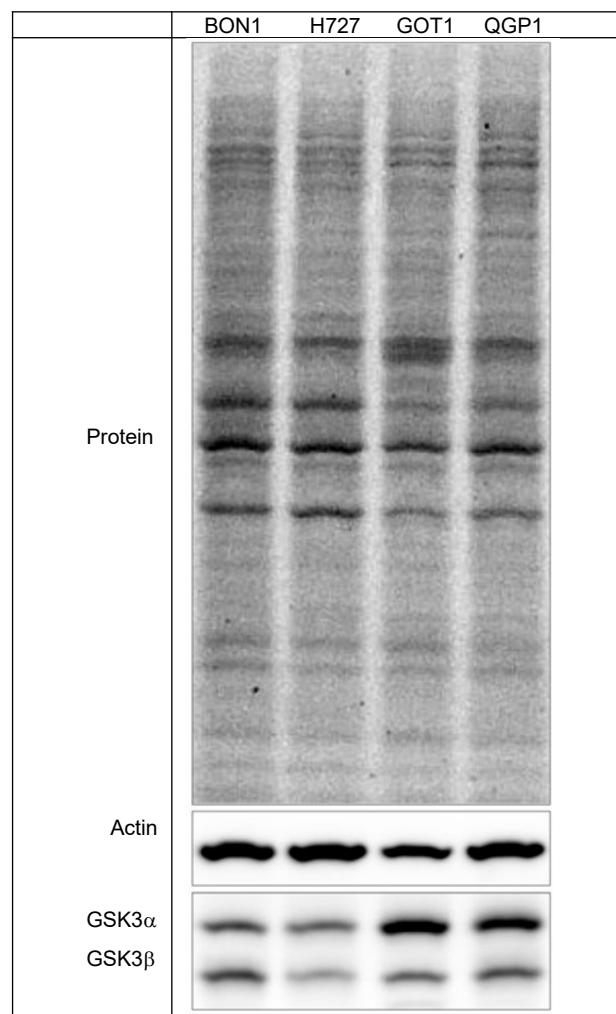
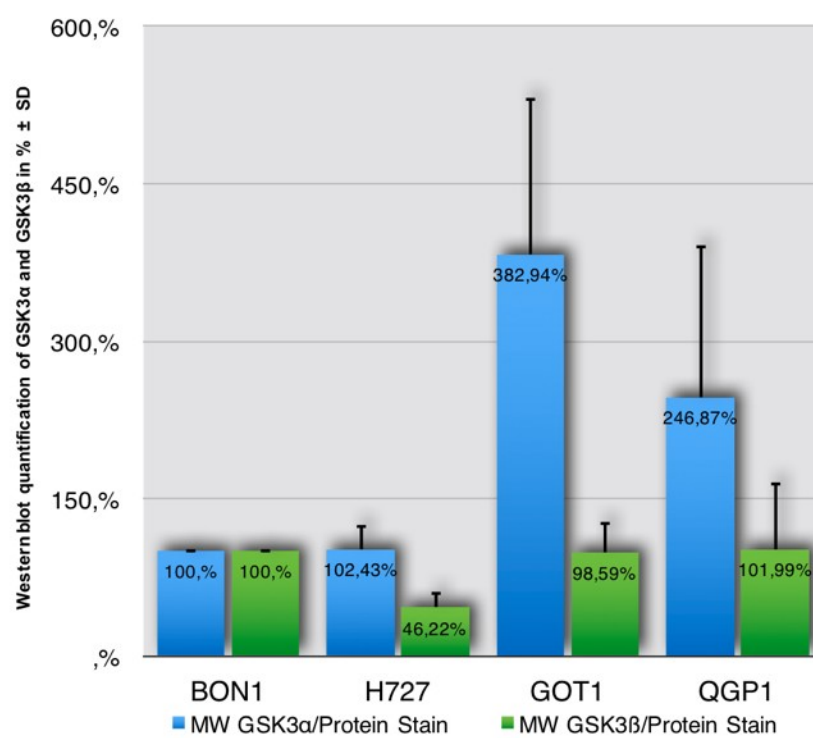


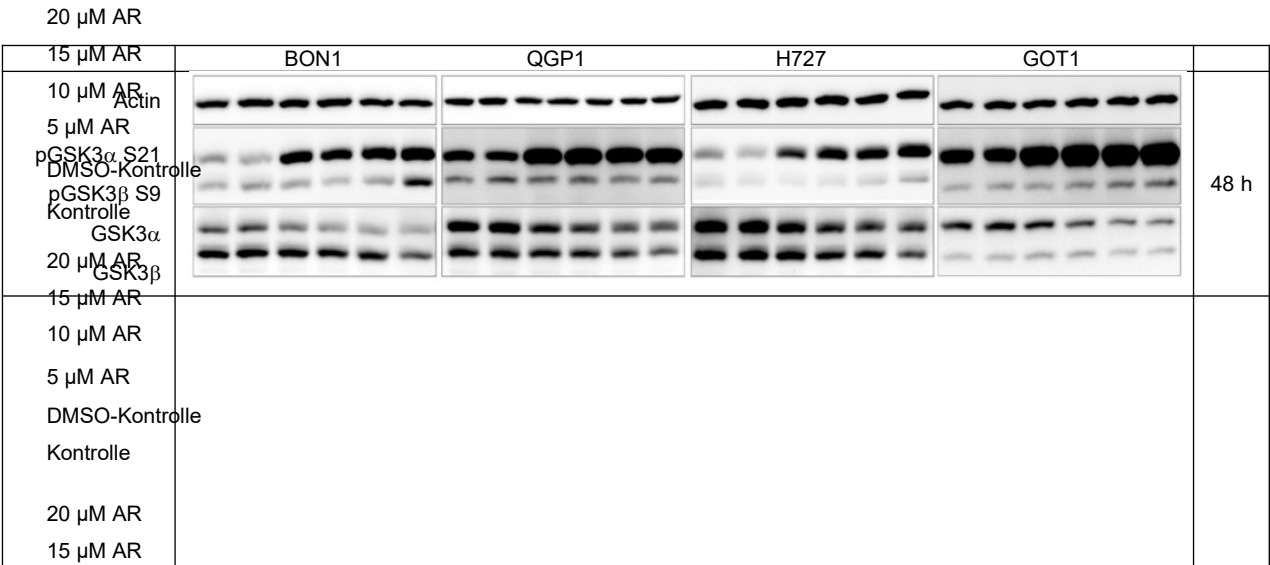
Abbildung 6: *Western Blot der GSK3 α / β -Expression [1].* Es zeigte sich eine unterschiedliche GSK3 α / β -Expression in BON1-, H727-, GOT1- und QGP1-Zellen [1]. Als Ladungskontrolle werden die Proteinfärbung und β -Actin gezeigt [1].



(MW = Mittelwert)

Abbildung 7: Quantifizierung der Western Blots von GSK3 α/β [1]. Es zeigte sich eine GSK3 α/β -Expression in unterschiedlicher Stärke in den untersuchten Zelllinien. Am stärksten war sie in GOT1-Zellen, gefolgt von QGP1-Zellen, ausgeprägt. Am schwächsten war die GSK3 α/β -Expression in BON1- und H727-Zellen zu beobachten [1].

In den Western Blots zeigte sich eine Serinphosphorylierung/GSK3 α -Inhibierung bereits nach 2 h ab AR-A014418-Konzentrationen von 5 μ M in allen vier Zelllinien, eine GSK3 β -Hemmung hingegen erst ab AR-A014418-Konzentrationen von 10 μ M nach 48 h Behandlung in GOT1- und BON1-Zellen und von 20 μ M in H727-Zellen (s. Abbildung 8 und Anhang Abbildungen 1, 3 und 4). In QGP1-Zellen blieb eine vollständige GSK3 β -Hemmung ganz aus (s. Abbildung 8 und Anhang Abbildung 2) [1].



10 μ M AR
5 μ M AR
DMSO-Kontrolle
Kontrolle
20 μ M AR
15 μ M AR
10 μ M AR
5 μ M AR
DMSO-Kontrolle
Kontrolle

Abbildung 8: Western Blot der GSK3 α/β -Hemmung [1]. Eine GSK α -Hemmung zeigte sich in allen vier Zelllinien nach 48 h bei allen getesteten AR-A014418-Konzentrationen. Eine GSK3 β -Hemmung zeigte sich nach 48 h in GOT1-Zellen ab

10 μM , in BON1- und H727-Zellen bei 20 μM , in QGP1-Zellen blieb sie hingegen ganz aus [1]. Als Ladungskontrolle werden die Proteinfärbung und β -Actin gezeigt [1].

4.2) Zellproliferation

AR-A014418

Es konnte eine dosis- und zeitabhängige signifikante Reduktion des Zellüberlebens in allen vier untersuchten Zelllinien nach Behandlung mit AR-A014418 gezeigt werden [1].

GOT1-Zellen reagierten hierbei am sensibelsten auf die Behandlung mit einem IC_{50} von 17,8 μM nach 144 h bzw. von 21,4 μM nach 72 h (s. Tabelle 10 und Anhang Tabelle 2). Der IC_{50} ist hierbei die mittlere inhibitorische Konzentration bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird und wurde mit Hilfe einer logistischen Regressionsanalyse von mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt. In GOT1-Zellen zeigte sich eine signifikante Reduktion des Zellüberlebens ab Konzentrationen von AR-A014418 $> 5 \mu\text{M}$ nach beiden untersuchten Zeitwerten (s. Abbildung 8). Die stärkste Hemmung des Zellwachstums wurde bei einer Konzentration von 100 μM nach 144 h erreicht und lag bei 96 % (s. Tabelle 10) [1].

In BON1-Zellen zeigte sich eine signifikante Reduktion des Zellüberlebens bei allen getesteten AR-A014418-Konzentrationen und Zeitwerten (s. Abbildung 9). Der IC_{50} lag nach 144 h bei 21,7 μM und nach 72 h bei 48 μM , das Zellüberleben sank um bis zu 87 % bei 100 μM nach 144 h (s. Tabelle 10 und Anhang Tabelle 2) [1].

In QGP1-Zellen betrug der IC_{50} 22,9 μM nach 144 h, nach 72 h lag er bei über 100 μM und wurde somit durch unsere Experimente nicht bestimmt (s. Tabelle 10 und Anhang Tabelle 2). Das Zellüberleben sank um bis zu 85 % bei 100 μM AR-A014418 nach 144 h (s. Abbildung 10). Alle Effekte auf das Zellüberleben zeigten eine statistische Signifikanz außer die AR-A014418-Behandlung von 10 μM nach 144 h [1].

H727-Zellen reagierten am unsensibelsten von den vier getesteten Zelllinien auf die Behandlung mit AR-A014418. Der IC_{50} lag nach 144 h bei 23,5 μM , nach 72 h betrug er über 100 μM und wurde somit durch unsere Experimente nicht bestimmt (s. Tabelle 10 und Anhang Tabelle 2). Es zeigte sich wie in BON1-Zellen eine signifikante Reduktion des Zellüberlebens bei allen getesteten Konzentrationen und Zeitwerten (s. Abbildung 11). Das Zellüberleben sank um bis zu 78 % bei 100 μM nach 144 h (s. Tabelle 10) [1].

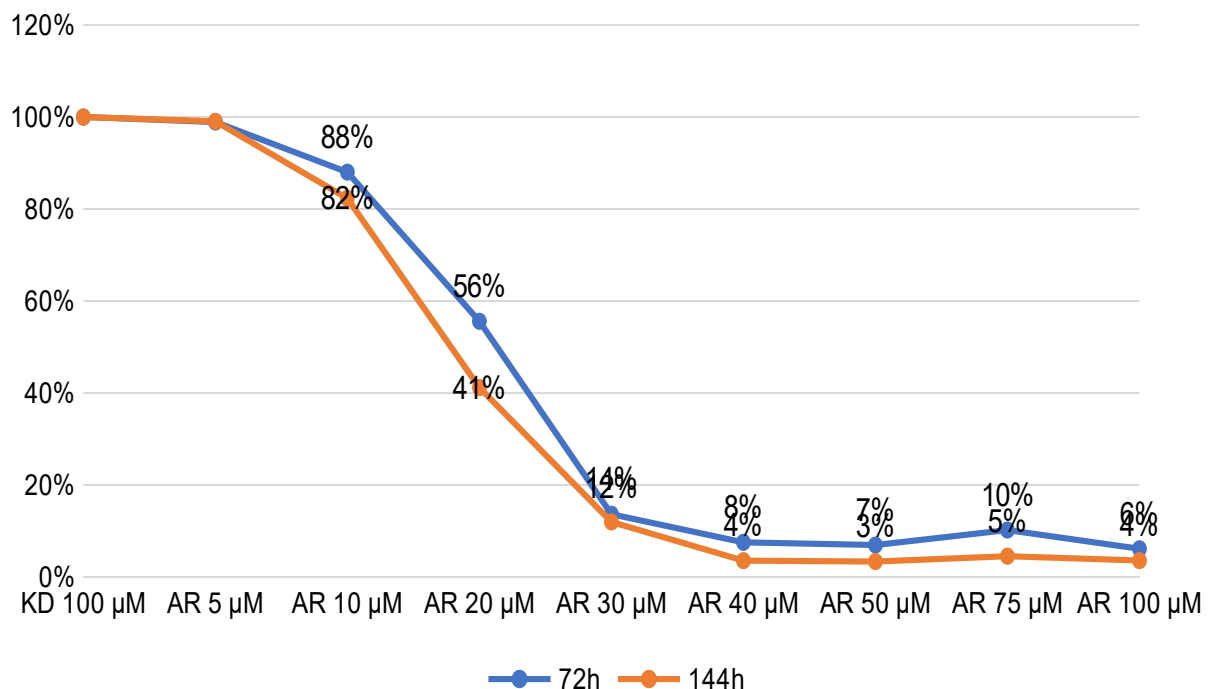
144 h	DMSO	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	IC_{50}
-------	------	----	----	----	----	----	----	----	----	------------------

	100 μM	5 μM	10 μM	20 μM	30 μM	40 μM	50 μM	75 μM	100 μM	[μM]
BON1	100%	75%***	67%***	54%***	32%***	27%** *	21%***	15%***	13%***	21,7
QGP1	100%	108%**	99%	59%***	28%***	23%** *	23%***	18%***	15%***	22,9
H727	100%	88%***	81%***	59%***	34%***	33%** *	31%***	25%***	22%***	23,5
GOT1	100%	99%	82%***	41%***	12%***	4%***	3%***	5%***	4%***	17,8

(AR-A0 = AR-A014418; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Tabelle 10: Zellproliferation nach AR-A014418-Gabe nach 144 h [1].
Gezeigt sind alle Zellproliferationswerte mit Signifikanz-Angaben für die Zelllinien BON1, QGP1, H727 und GOT1 nach 144 h Inkubation bei Konzentrationen von 5 μM – 100 μM AR-A014418 [1].

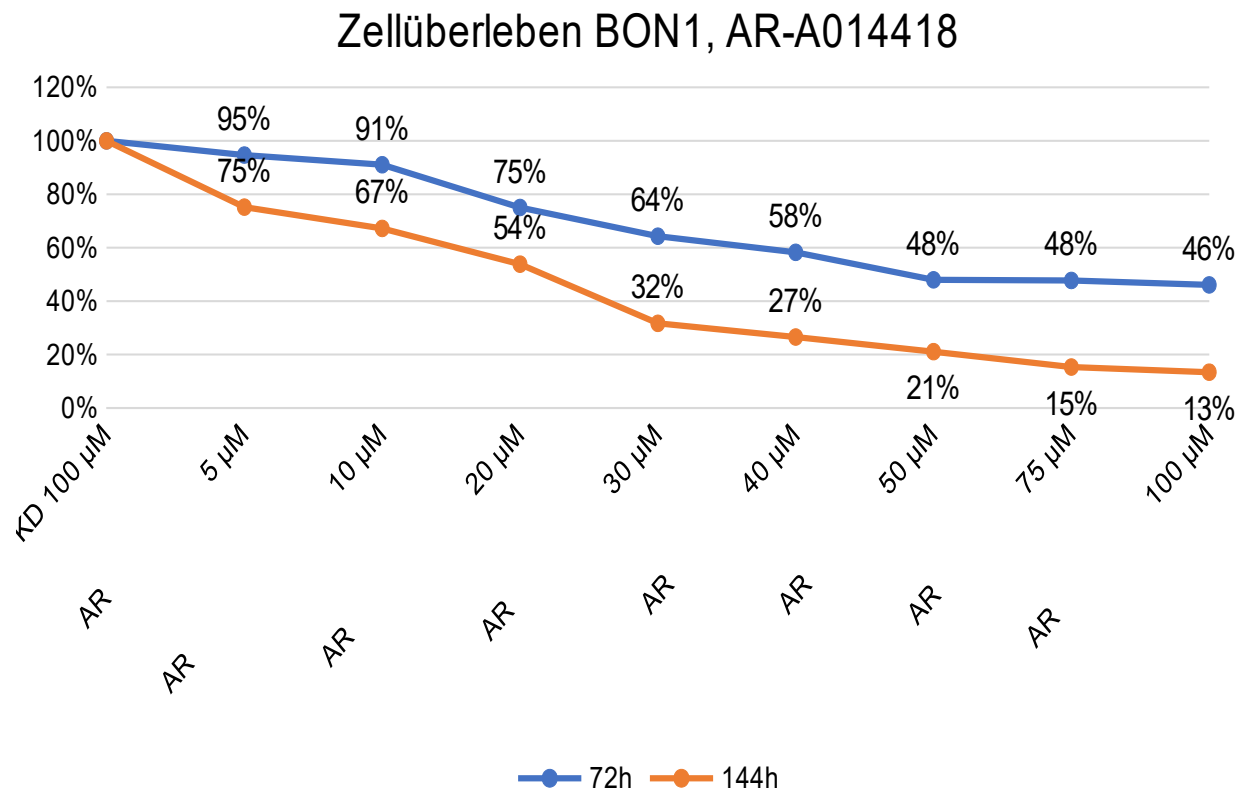
Zellüberleben GOT1, AR-A014418



(AR = AR-A014418; KD = DMSO-Kontrolle)

Abbildung 9: Zellüberleben nach AR-A014418-Gabe in GOT1-Zellen [1].
Nach 72 h zeigte sich in GOT1-Zellen bei Konzentrationen von AR-A014418 > 5 μM ein statistisch signifikanter Rückgang des Zellwachstums. Bei 10 μM AR-A014418 fiel es nach 72 h um 12 %, bei

100 μM um 94 %. Nach 144 h fiel das Zellwachstum ebenfalls bei Konzentrationen von AR-A014418 $> 5 \mu\text{M}$ signifikant. Bei 10 μM ging es um 18 %, bei 100 μM um 96 % zurück [1].

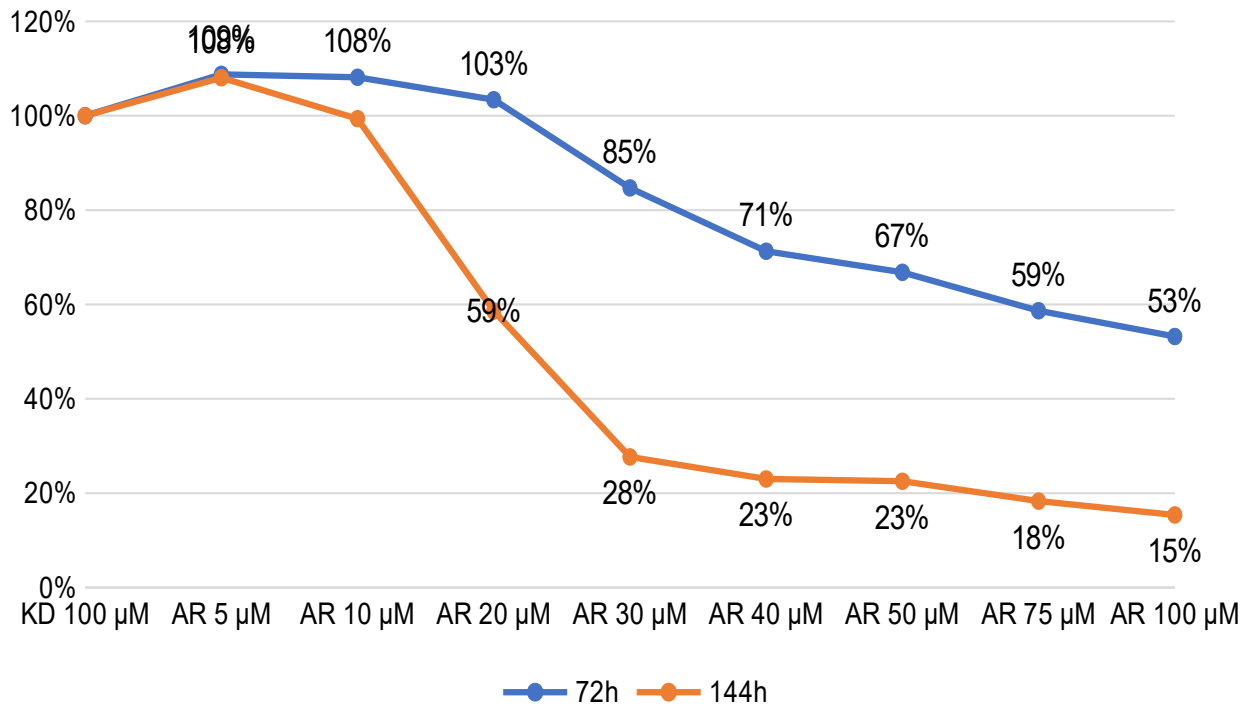


(AR = AR-A014418; KD = DMSO-Kontrolle)

Abbildung 10: Zellüberleben nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1].

Nach 72 h zeigte sich in BON1-Zellen bei allen getesteten Konzentrationen von AR-A014418 (5 µM – 100 µM) ein statistisch signifikanter Rückgang des Zellwachstums. Bei 5 µM AR-A014418 fiel es um 5 %, bei 100 µM um 54 %. Nach 144 h fiel das Zellwachstum ebenfalls bei allen getesteten Konzentrationen von AR-A014418 signifikant. Bei 5 µM ging es hierbei um 25 %, bei 100 µM um 87 % zurück [1].

Zellüberleben QGP1, AR-A014418



(AR = AR-A014418; KD = DMSO-Kontrolle)

Abbildung 11: Zellüberleben nach AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1].

Nach 72 h zeigte sich in QGP1-Zellen bei allen getesteten Konzentrationen von AR-A014418 (5 µM – 100 µM) ein statistisch signifikanter Effekt auf das Zellwachstum. Bei 5 µM AR-A014418 stieg es zunächst um 9 % an, bei 100 µM fiel es um 47 %. Nach 144 h stieg das Zellwachstum bei 5 µM ebenfalls zunächst um 8 % an, bei 100 µM fiel es um 85 % ab [1].

Zellüberleben H727, AR-A014418

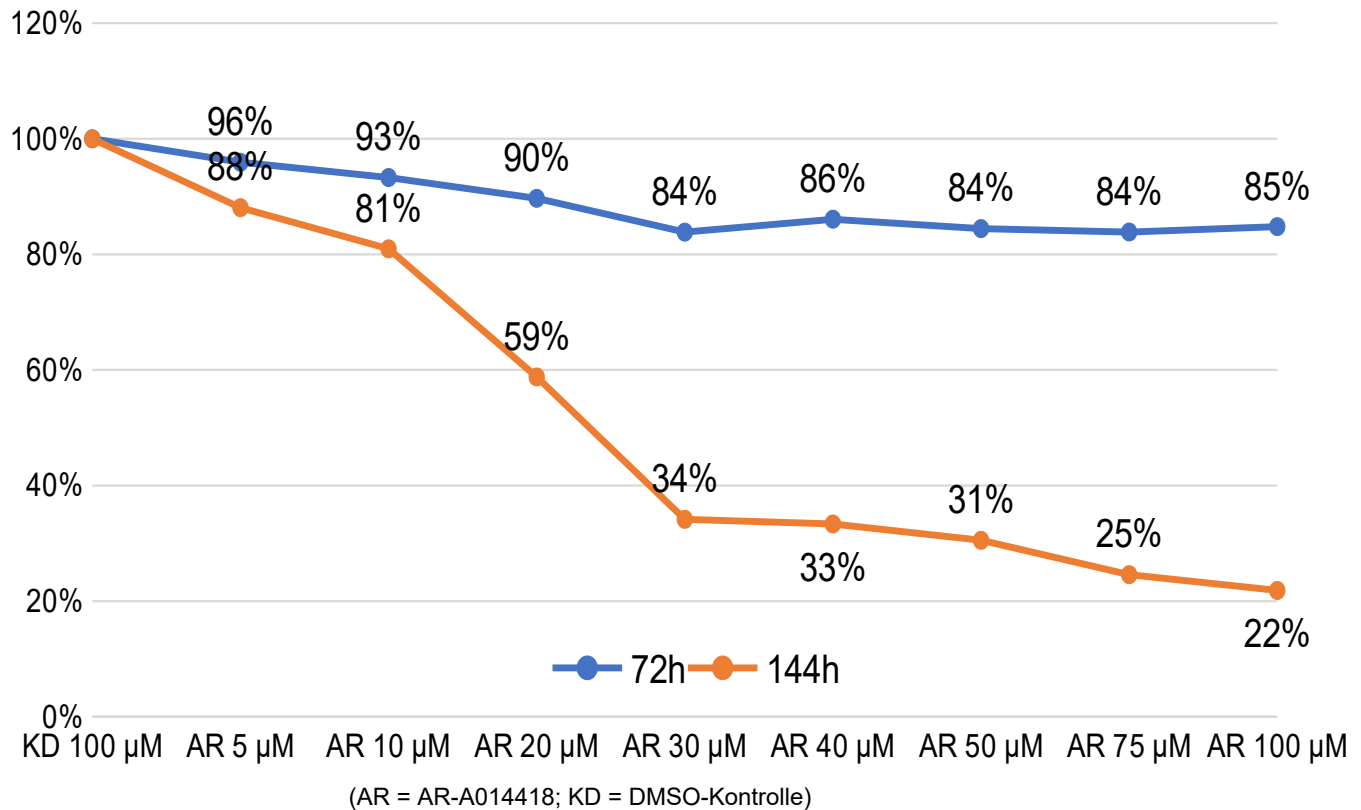


Abbildung 12: Zellüberleben nach AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1].

Nach 72 h zeigte sich in H727-Zellen bei allen getesteten Konzentrationen von AR-A014418 (5 µM – 100 µM) ein statistisch signifikanter Rückgang des Zellwachstums. Bei 5 µM AR-A014418 fiel es um 4 %, bei 100 µM um 15 % ab. Nach 144 h fiel das Zellwachstum ebenfalls bei allen getesteten Konzentrationen von AR-A014418 signifikant ab. Bei 5 µM fiel es um 12 %, bei 100 µM um 88 % ab [1].

Aufgrund der bereits durch die Einzelsubstanzgabe guten Wirksamkeit von AR-A014418 in GOT1-Zellen wurden die Kombinationsbehandlungen nur mit den weniger sensiblen Zelllinien BON1, QGP1 und H727 durchgeführt [1].

AR-A014418 plus Everolimus

Die Kombination mit dem mTORC1-Inhibitor Everolimus zeigte nur einen leichten synergistischen Effekt in sehr niedrigen Konzentrationsbereichen und einen additiven Effekt in niedrigen Konzentrationsbereichen in QGP1- und H727-Zellen (s. Anhang Abbildungen 26, 27). In höheren Konzentrationsbereichen zeigte sich sogar ein antagonistischer Effekt in allen drei untersuchten Zelllinien (s. Anhang Abbildungen 25 – 27). Die genauen Werte des Zellüberlebens für die Kombinationsbehandlungen mit AR-A014418 plus Everolimus sind den Tabellen 3 – 5 im Anhang zu entnehmen [1].

Die mTORC1-Effektorproteine S6, p70S6K und 4EBP1 waren erst ab Konzentrationen von $\geq 10 \mu\text{M}$ AR-A014418 nach 48 h deutlich gehemmt/dephosphoryliert in BON1-, QGP1- und H727-Zellen, mit Ausnahme der S6, die in QGP1-Zellen bereits bei $5 \mu\text{M}$ gehemmt war (s. Abbildung 12 und Anhang Abbildungen 5 – 13) [1].

Interessanterweise konnte in den sensibleren GOT1-Zellen eine frühere Hemmung der mTORC1-Effektorproteine ab $\geq 5 \mu\text{M}$ AR-A014418 beobachtet werden (s. Abbildung 12 und Anhang Abbildungen 14 – 16) [1].

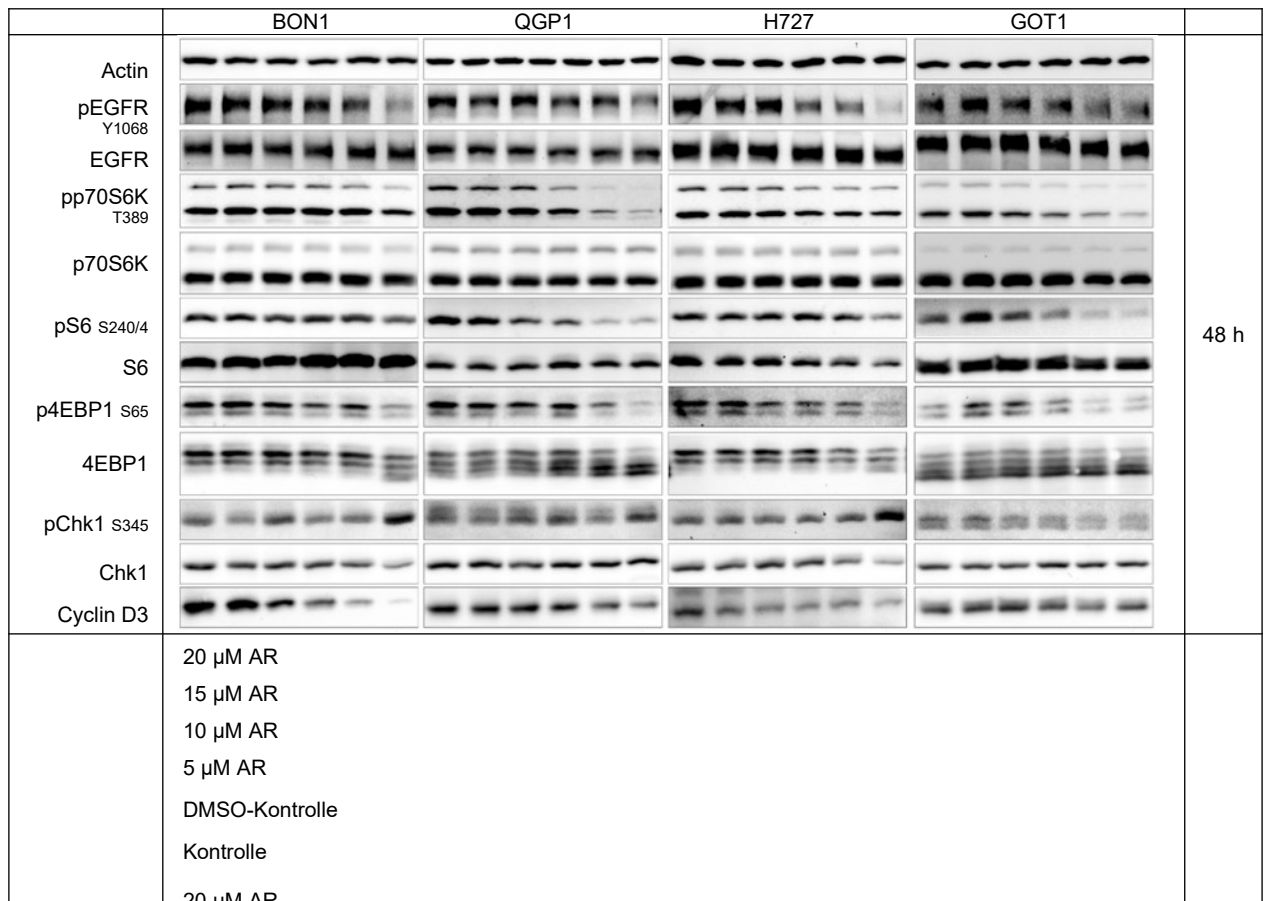


Abbildung 13: Western Blot von Regulator- und Zellzyklusproteinen [1].

Eine Übersicht über relevante Proteine, die im Western Blot bei AR-A014418-Behandlungen von 5 – 20 µM durchgeführt wurden in den Zelllinien BON1, QGP1, H727 und GOT1 [1]. Als Ladungskontrolle wird β-Actin gezeigt [1].

AR-A014418 plus Lovastatin

Neben einer mTORC1-Signalwegshemmung führte eine Inhibierung der GSK3 durch AR-A014418 nach einer Kurzzeitbehandlung von 2 h zu einer *Aktivierung* von Akt und ERK (s. Abbildung 13). Akt und ERK sind wie in der Einleitung beschrieben Teil des PI3K/Akt/mTORC1- bzw. Raf1/MEK/ERK-Signalweges und werden ebenso wie die bereits erwähnten mTORC1-Effektorproteine durch Phosphorylierung aktiviert (pAkt und pERK) [1].

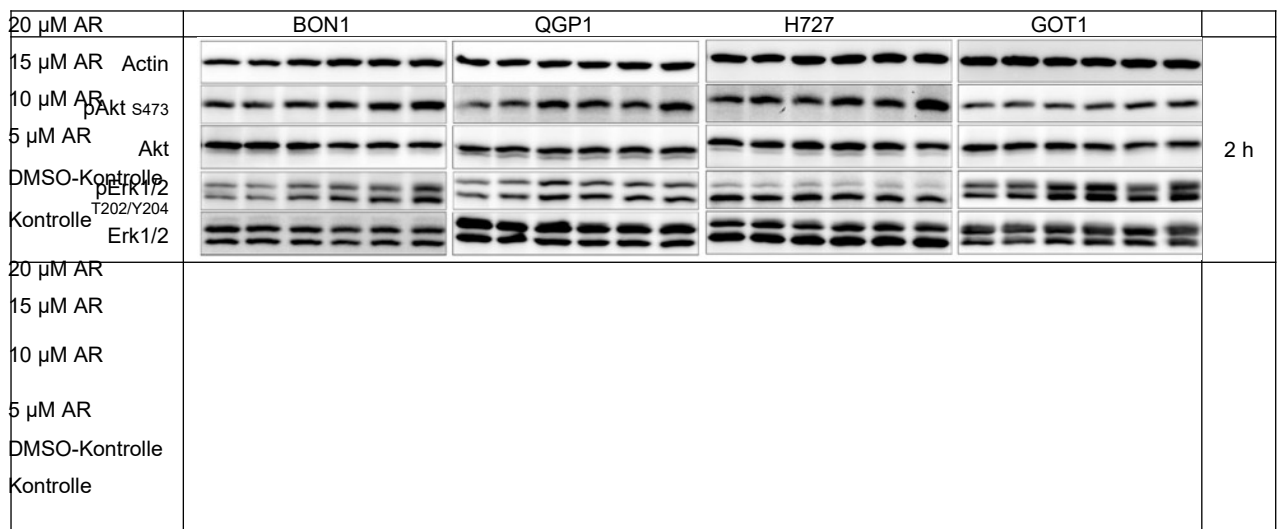
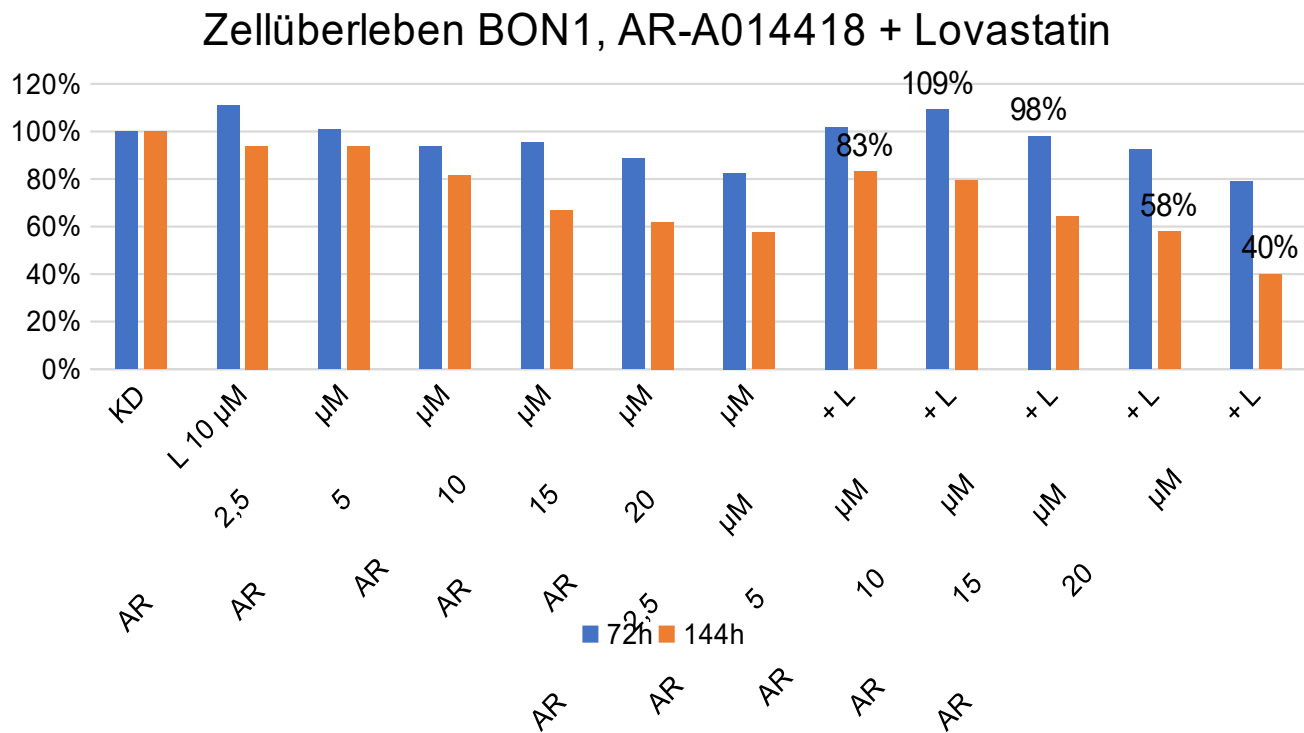


Abbildung 14: Western Blot von Act und ERK nach AR-A014418-Kurzinkubation
 Eine Aktivierung von Akt und ERK konnte nach einer Kurzzeitbehandlung von 2 h in allen vier untersuchten Zelllinien gezeigt werden [1]. Als Ladungskontrolle wird β -Actin gezeigt [1].

Eine Akt-Aktivierung wurde in QGP1- und GOT1-Zellen ab Konzentrationen von 5 µM, in BON1-Zellen ab 10 µM und in H727-Zellen ab 20 µM AR-A014418 beobachtet (s. Anhang Abbildungen 17 – 20) [1].

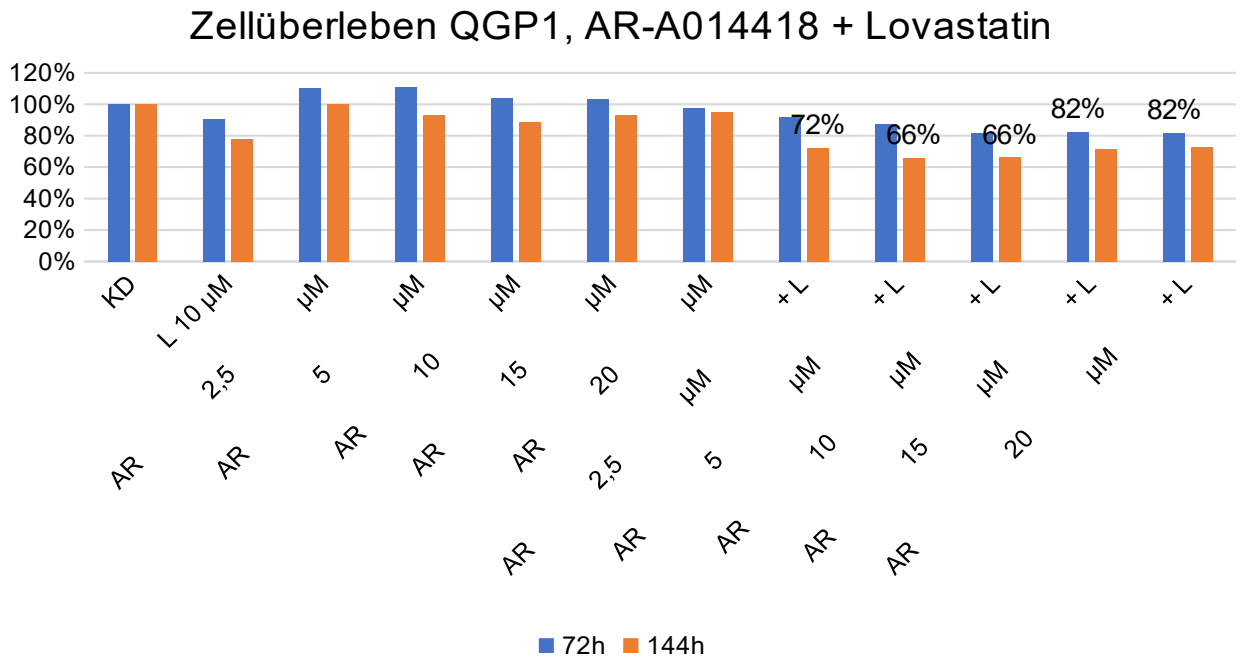
Eine ERK-Aktivierung zeigte sich hingegen nur in den Zelllinien BON1, QGP1 und GOT1, am stärksten ausgeprägt bei einer AR-A014418 Konzentration von 10 µM (s. Anhang Abbildungen 21 – 24) [1].

Um diesen Escape-Mechanismus der Zelle zu hemmen, kombinierten wir AR-A014418 mit dem HMG-CoA-Reduktasehemmer Lovastatin, der in mehreren neuroendokrinen Tumorzelllinien eine Akt- und ERK-Inhibierung gezeigt hatte [338]. Die Kombinationsbehandlung zeigte in BON1-Zellen einen signifikanten synergistischen Effekt in der niedrigsten und höchsten getesteten Dosis und einen additiven Effekt in allen andere Dosen, in QGP1-Zellen zeigte sich ein vorwiegend synergistischer Effekt (s. Abbildungen 14 und 15). Der Effekt war in QGP1-Zellen jedoch nur gering ausgeprägt [1].



(AR = AR-A014418; L = Lovastatin 10 μ M; KD = DMSO-Kontrolle;
syn = synergistisch; add = additiv; „+“ = $p < 0,05$)

Abbildung 15: Zellüberleben nach AR-A014418- plus Lovastatin-Gabe in BON1-Zellen [1]. In BON1-Zellen zeigte sich bei höchster (20 μ M AR-A014418 + 10 μ M Lovastatin) und niedrigster Kombinationsgabe (2,5 μ M AR-A014418 + 10 μ M Lovastatin) von AR-A014418 plus Lovastatin ein signifikanter synergistischer Effekt. Bei den restlichen Kombinationsgaben zeigte sich ein signifikanter additiver Effekt (5 μ M – 15 μ M AR-A014418 + 10 μ M Lovastatin) [1].



(AR = AR-A014418; L = Lovastatin 10 μM; KD = DMSO-Kontrolle;
syn = synergistisch; add = additiv; „+“ = $p < 0,05$)

Abbildung 16: Zellüberleben nach AR-A014418- plus Lovastatin-Gabe in QGP1-Zellen [1]. In QGP1-Zellen zeigte sich ein signifikanter synergistischer Effekt bei Kombinationsgaben von AR-A014418 plus Lovastatin (2,5 μM – 15 μM AR-A014418 + 10 μM Lovastatin), nur bei der höchsten Kombinationskonzentration zeigte sich ein additiver Effekt (20 μM AR-A014418 + 10 μM Lovastatin) [1].

In H727-Zellen zeigte sich ausschließlich ein signifikanter additiver Effekt (s. Anhang Abbildung 28). Die genauen Werte des Zellüberlebens für die Kombinationsbehandlungen von AR-A014418 plus Lovastatin in den drei untersuchten Zelllinien BON1, QGP1 und H727 sind den Tabellen 6 – 8 im Anhang zu entnehmen [1].

In den Western Blots konnte gezeigt werden, dass die Kombination von AR-A014418 mit Lovastatin die durch AR-A014418-Einzelgabe induzierte kompensatorische Aktivierung von Akt und ERK in BON1-Zellen verhinderte (s. Abbildung 16) [1].

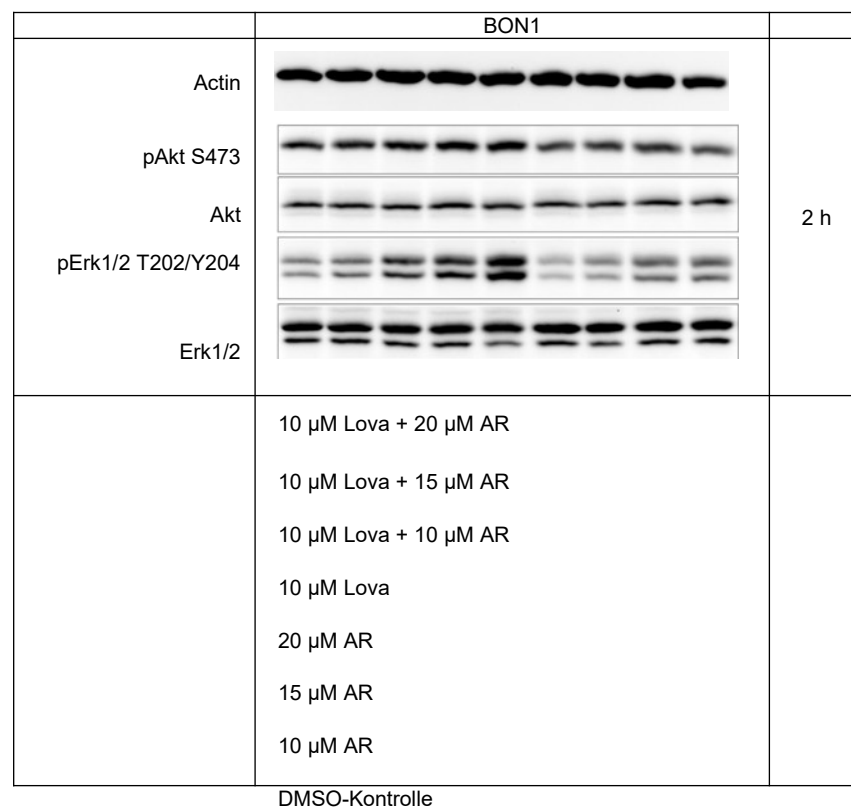


Abbildung 17: Western Blot von Akt und ERK nach AR-A014418- plus Lovastatin-Gabe [1]. In BON1-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Kombination von AR-A014418 mit Lovastatin die kompensatorische Aktivierung von Akt und ERK nach 2 h verhinderte [1]. Als Ladungskontrolle wird β -Actin gezeigt [1].

AR-A014418 plus 5-FU

5-Fluoropyrimidin-Derivate wie 5-FU oder Capecitabin werden in Chemotherapieprotokollen zur Behandlung von pankreatischen und pulmonalen NETs eingesetzt [356]. Vor diesem Hintergrund wurde 5-FU mit AR-A014418 kombiniert [1].

Es zeigte sich in QGP1-Zellen ein signifikanter synergistischer Effekt bei allen getesteten Kombinationen nach 144 h und 72 h Behandlung (s. Abbildung 17) [1].

In H727-Zellen zeigte sich bei allen getesteten Kombinationen außer 10 µM AR-A014418 plus 5 µM 5-FU ein signifikanter additiver Effekt (s. Anhang Abbildung 29) [1].

In BON1-Zellen zeigten sich bei allen getesteten Kombinationsgaben nur geringe, statistisch signifikante Effekte (s. Anhang Abbildung 30) [1].

Die genauen Zellproliferationswerte für alle drei untersuchten Zelllinien für die Kombinationsgaben AR-A014418 plus 5-FU sind im Anhang Tabellen 9 – 11 zu entnehmen.

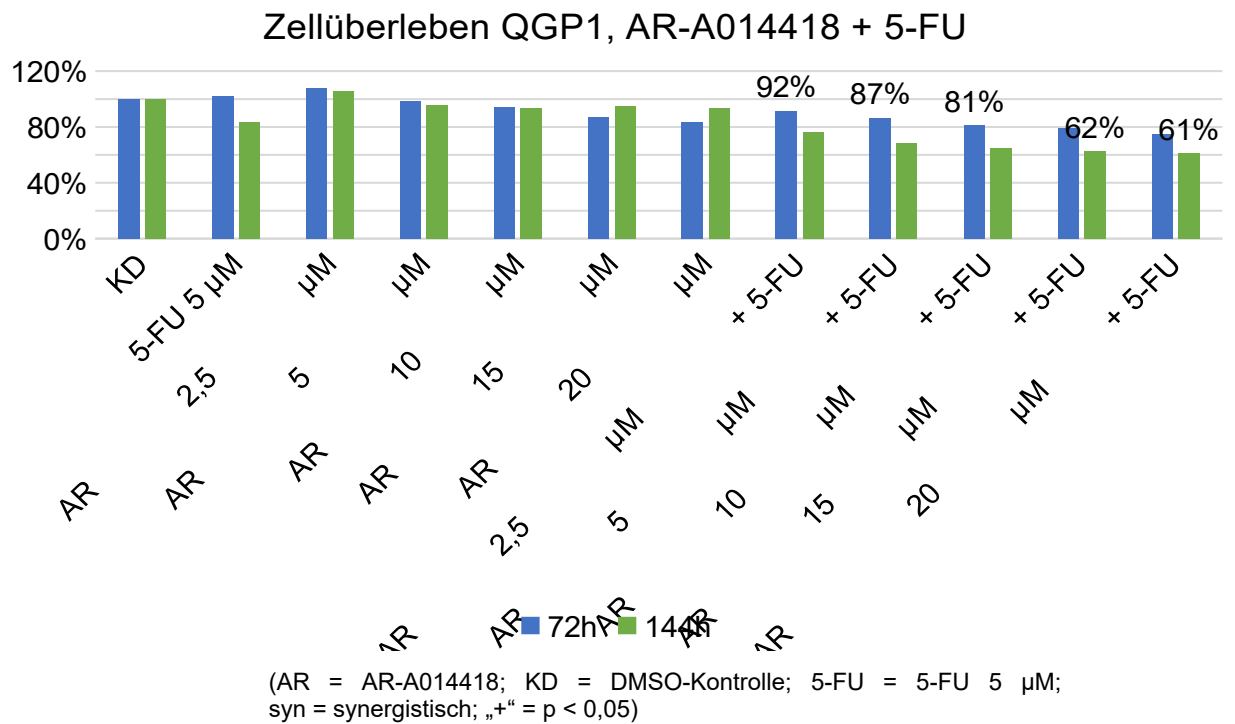


Abbildung 18: Zellüberleben nach AR-A014418- plus 5-FU-Gabe in QGP1-Zellen [1]. In QGP1-Zellen zeigte sich ein signifikanter synergistischer Effekt bei allen getesteten Kombinationsgaben von AR-A014418 plus 5-FU (2,5 µM – 20 µM AR-A014418 + 5 µM 5-FU) [1].

4.3) Zellmigration

Die Migrationsfähigkeit der Zelle war in allen drei getesteten Zelllinien BON1, QGP1 und H727 nach 48 h bei AR-A014418-Konzentrationen von 20 μ M statistisch signifikant verringert (s. Abbildungen 19, 21 und 23). Mit GOT1-Zellen konnte aufgrund ihrer sehr langen Verdopplungszeit von etwa 3 Wochen der Zellmigrationsassay nicht durchgeführt werden [1][344].

Am stärksten war die Zellmigration in BON1-Zellen herabgesetzt, nach 48 h und einer AR-A014418-Behandlung mit 20 μ M waren nur 10 % des Migrationsspalt bewachsen, im Vergleich hierzu waren in der DMSO-Kontrolle auf 61 % des Spaltes Zellen gewachsen (s. Abbildung 18) [1].

In H727-Zellen ließ sich nach 48 h und einer Behandlung mit 20 μ M AR-A014418 ebenfalls eine verringerte Migration beobachten, so waren nur 16 % des Spaltes bewachsen (s. Abbildung 22). Im Vergleich hierzu waren in der Kontrolle 41 % des Spaltes bewachsen (s. Abbildung 22) [1].

In QGP1-Zellen wurde die Zellmigration am geringsten gehemmt, so waren nach 48 h und einer AR-A014418-Behandlung mit 20 μ M nur 8 % der ursprünglichen Fläche bewachsen, jedoch waren auch nur 22 % des Spaltes in der DMSO-Kontrolle bewachsen (s. Abbildung 20) [1].

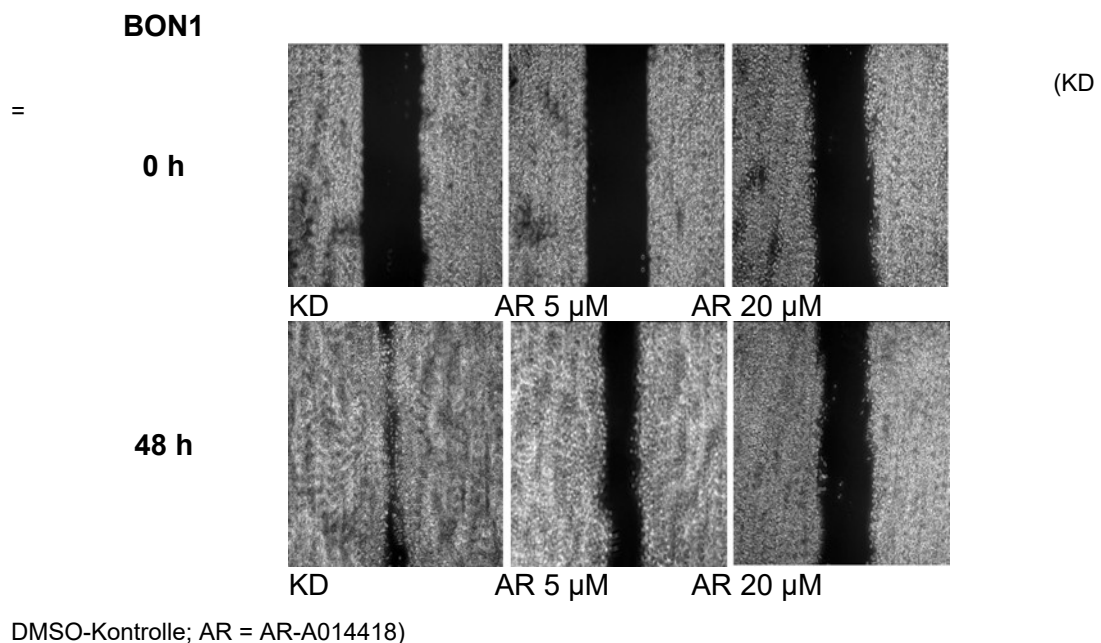
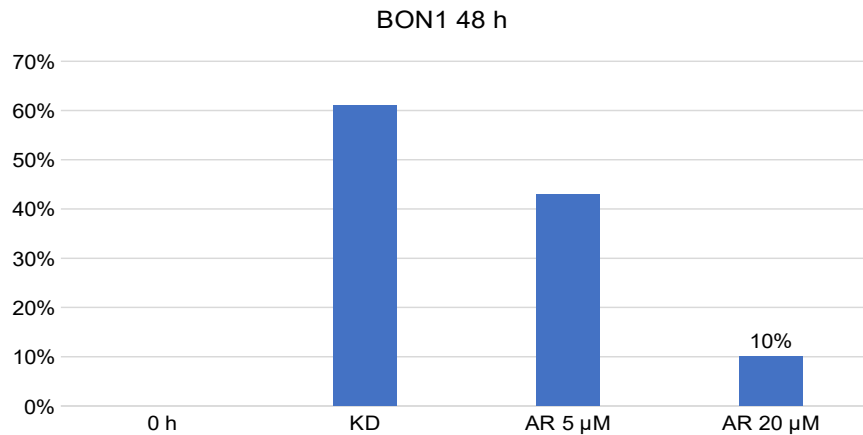


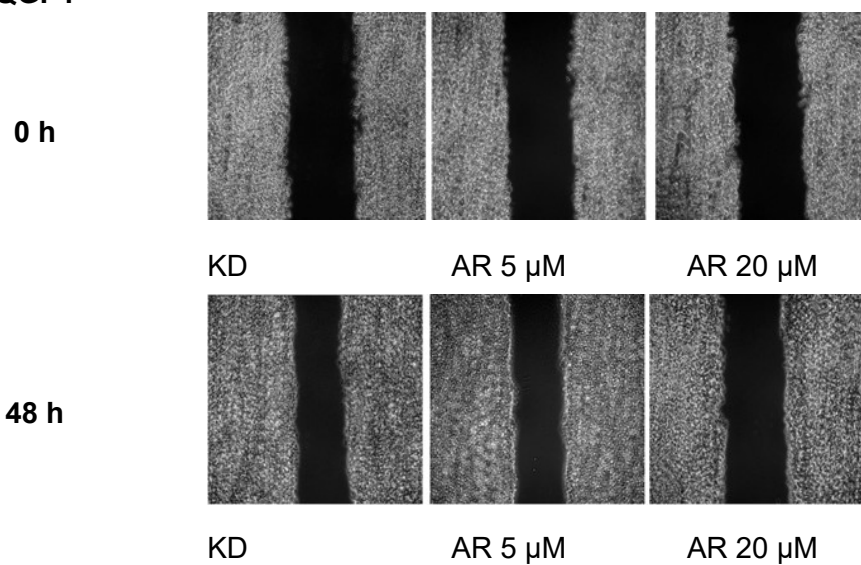
Abbildung 19: Zellmigration nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1]. Fotoaufnahmen des Spaltes zum Zeitpunkt null und nach einer 48 h Behandlung mit 5 μ M bzw. 20 μ M AR-A014418 in BON1-Zellen [1].



(KD = DMSO-Kontrolle; AR = AR-A014418)

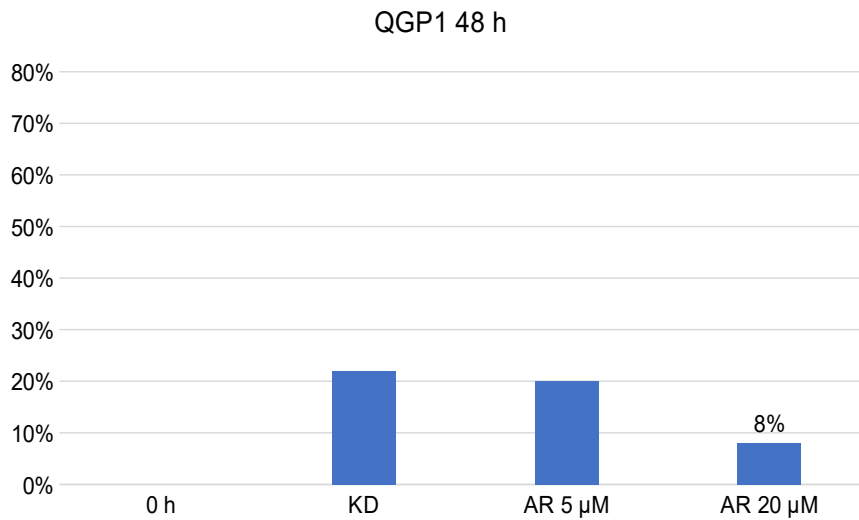
Abbildung 20: Quantifizierung der Zellmigration nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1]. In BON1-Zellen zeigte sich eine statistisch signifikant verminderte Zellmigrationsfähigkeit nach einer AR- A014418-Behandlung mit 20 μ M nach 48 h [1].

QGP1



(KD = DMSO-Kontrolle; AR = AR-A014418)

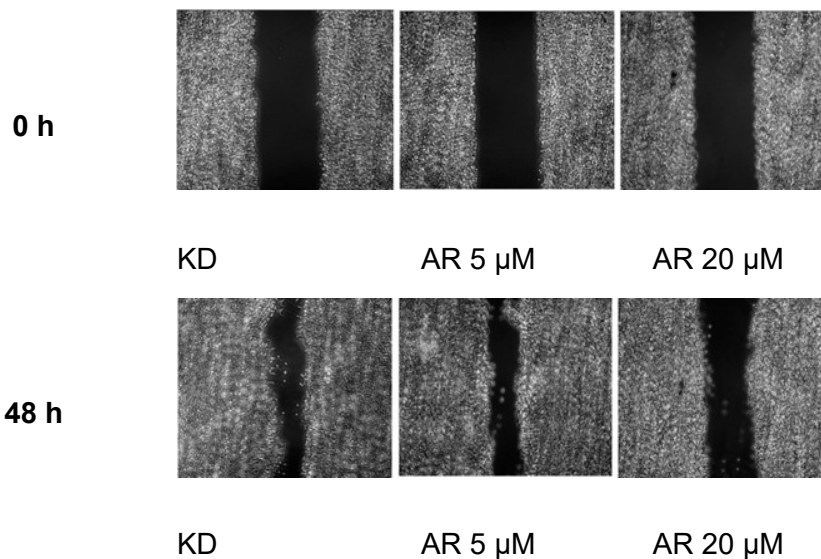
Abbildung 21: Zellmigration nach AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1]. Fotoaufnahmen des Spaltes zum Zeitpunkt null und nach einer 48 h Behandlung mit 5 μ M bzw. 20 μ M AR-A014418 in QGP1-Zellen [1].



(KD = DMSO-Kontrolle; AR = AR-A014418)

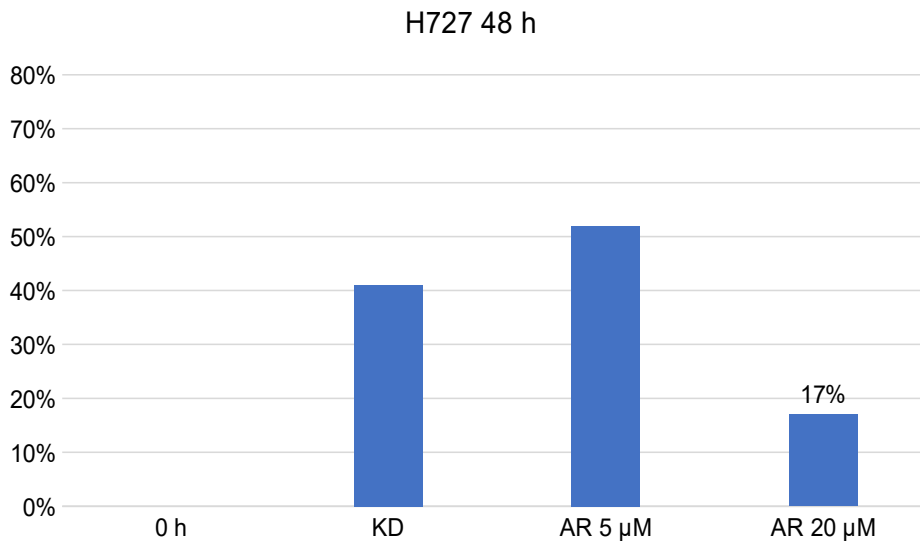
Abbildung 22: Quantifizierung der Zellmigration nach AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1]. In QGP1-Zellen zeigte sich eine statistisch signifikant verminderte Zellmigrationsfähigkeit nach einer AR- A014418-Behandlung mit 20 μ M nach 48 h [1].

H727



(KD = DMSO-Kontrolle; AR = AR-A014418)

Abbildung 23: Zellmigration nach AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1]. Fotoaufnahmen des Spaltes zum Zeitpunkt null und nach einer 48 h Behandlung mit 5 μ M bzw. 20 μ M AR-A014418 in H727-Zellen [1].



(KD = DMSO-Kontrolle; AR = AR-A014418)

Abbildung 24: Quantifizierung der Zellmigration nach AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1]. In H727-Zellen zeigte sich eine statistisch signifikante verminderte Zellmigrationsfähigkeit nach einer AR-A014418-Behandlung mit 20 μ M nach 48 h [1].

Nach 48 h AR-A014418-Behandlung und ab Konzentrationen von 15 μ M war in BON1-, QGP1- und H727-Zellen eine Abnahme von β -Catenin zu beobachten (s. Abbildung 24 und Anhang Abbildung 31) [1].

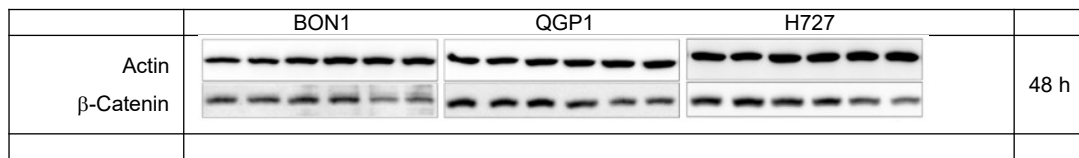
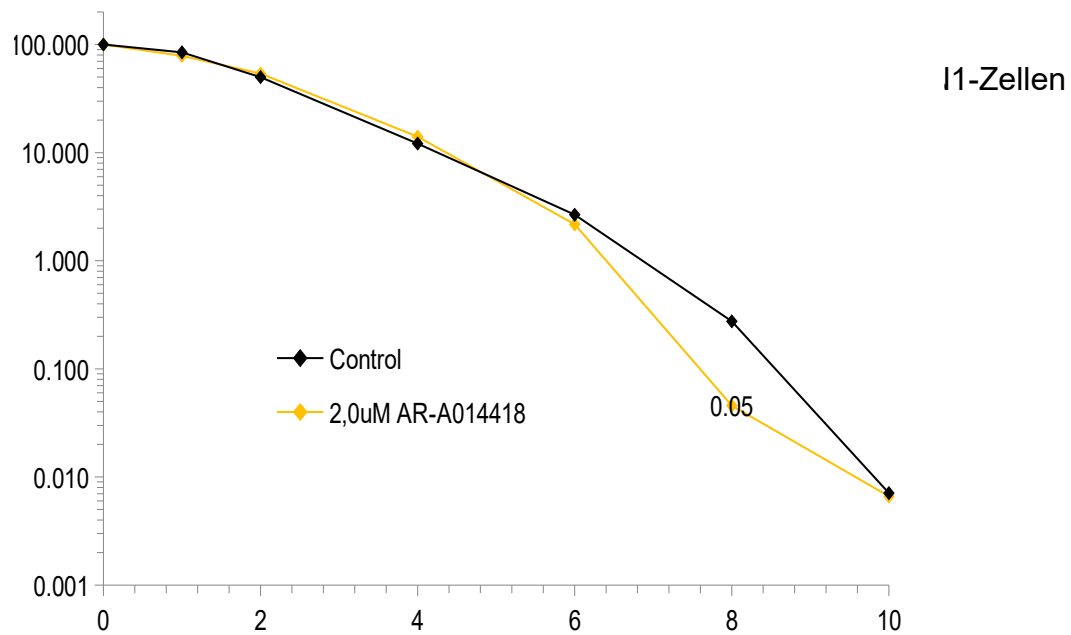


Abbildung 25: Western Blot von β -Catenin [1]. Der Western Blot zeigte eine Abnahme von β -Catenin in allen drei untersuchten Zelllinien ab einer AR-A014418-Konzentration von 15 μ M [1]. Als Ladungskontrolle wird β -Actin gezeigt [1].

20 μ M AR
15 μ M AR
10 μ M AR
5 μ M AR
DMSO-Kontrolle
Kontrolle
20 μ M AR
15 μ M AR

4.4) Bestrahlung

Es konnte nur ein minimaler Effekt der GSK3-Hemmung durch AR-A014418 auf die Radiosensibilität in den von uns untersuchten NET-Zelllinien gezeigt werden. Nach einer Vorbehandlung mit 2 μ M AR-A014418 und einer darauffolgenden γ -Bestrahlung mit 8 Gy zeigte sich in BON1- und QGP1-Zellen eine minimale, statistisch signifikante Radiosensibilisierung (s. Abbildungen 25 und 26). Da eine Bestrahlung mit 8 Gy außerhalb des klinisch anwendbaren Bereiches liegt, kann dieses Ergebnis als nicht relevant gewertet werden. In QGP1-Zellen zeigte sich zusätzlich bei 1 und 6 Gy nach einer AR-A014418-Vorbehandlung mit 2 μ M eine leichte signifikante Radiosensibilisierung (s. Abbildung 26). Da der Effekt bei 6 Gy jedoch so gering ausfiel, kann auch er als klinisch nicht relevant betrachtet werden. Nach einer Vorbehandlung mit 1 μ M AR-A014418 zeigte sich nur in QGP1-Zellen bei Bestrahlungsdosen von 2 Gy, 6 Gy und 8 Gy eine minimale signifikante Radiosensibilisierung, in BON1-Zellen hingegen kein Effekt (s. Anhang Abbildungen 39 und 40). Hier gilt bei 8 Gy ebenso wie nach einer Vorbehandlung mit 2 μ M AR-A014418, dass die Bestrahlungsdosis außerhalb des klinisch relevanten Bereiches liegt. Auch fiel der Effekt bei 6 Gy so gering aus, dass er fraglich relevant ist. In H727-Zellen zeigte sich kein signifikanter Effekt (s. Anhang Abbildungen 41 und 42). Genaue Werte für die Bestrahlung von BON1-, QGP1- und H727-Zellen nach AR-A014418-Vorbehandlungen mit 1 μ M oder 2 μ M mit Angabe der statistischen Signifikanzen können den Tabellen 12 – 14 im Anhang entnommen werden. Höhere Bestrahlungsdosen konnten aufgrund sich vom Untergrund ablösender Zellen und somit fehlender Zellkolonienbildung nicht durchgeführt werden [1].



(uM = μ M; Control = DMSO-Kontrolle)

Abbildung 26: Bestrahlung nach 2 μ M AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1]. In BON1-Zellen zeigte sich ein signifikanter, minimaler radiosensibilisierender Effekt nach einer Vorbehandlung mit 2 μ M AR-A014418 und einer Strahlendosis von 8 Gy. Nach einer AR-A014418-Vorbehandlung und einer nachfolgenden Bestrahlung mit 8 Gy fiel die Zellkolonienbildung um 99,95 %, ohne Vorbehandlung fiel sie um 99,72 %. Aufgrund der hohen Strahlendosis und des nur minimalen Unterschiedes im Zellüberleben ist der Effekt als klinisch nicht relevant zu werten [1].

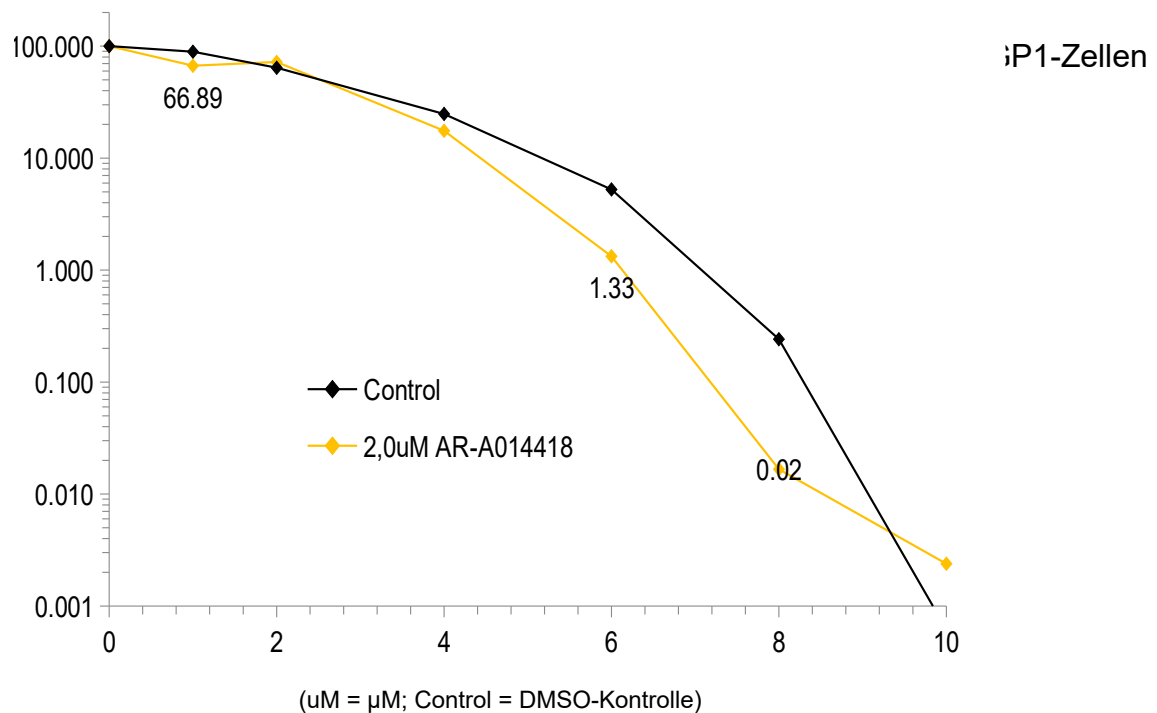


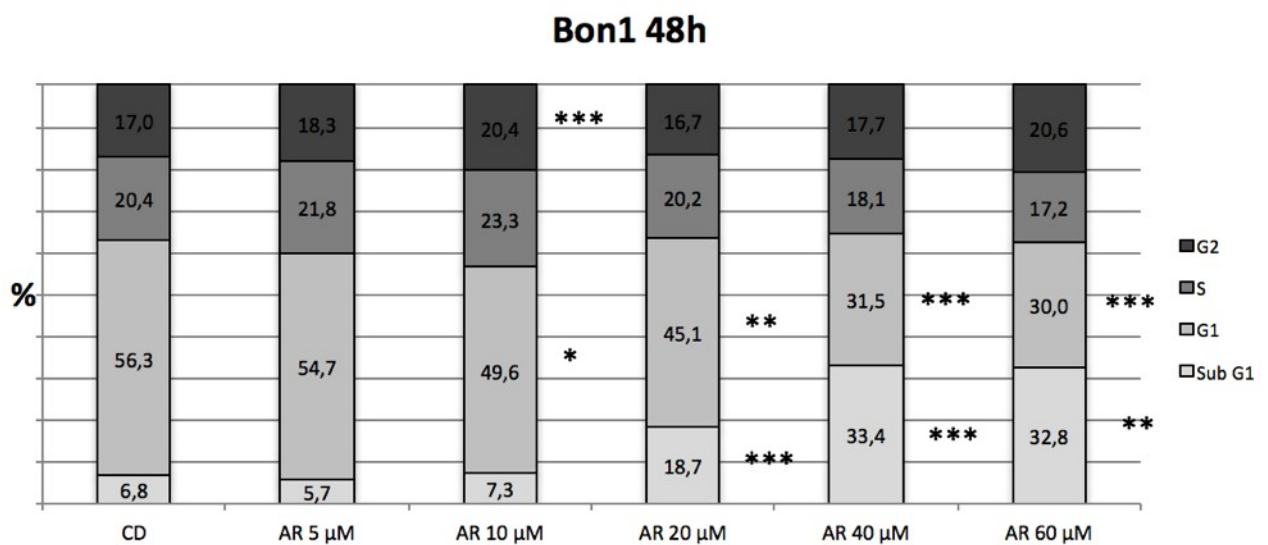
Abbildung 27: *Bestrahlung nach 2 μ M AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1].* In QGP1-Zellen zeigte sich ein signifikanter, leicht radiosensibilisierender Effekt nach einer Vorbehandlung mit 2 μ M AR-A014418 und einer Strahlendosis von 1, 6 und 8 Gy. Die Effekte bei 6 Gy und 8 Gy sind klinisch nicht relevant. Nach einer AR-A014418-Vorbehandlung und einer nachfolgenden Bestrahlung mit 1 Gy fiel die Zellkolonienbildung um 33,1 %, ohne Vorbehandlung fiel sie nur um 10,68 % [1].

4.5) Durchflusszytometrie (FACS)

In den Durchflusszytometrie (FACS)-Analysen konnte in allen vier untersuchten Zelllinien eine statistisch signifikante Zunahme der Sub-G1-Population nach 48 h gezeigt werden, was eine Zunahme toter Zellen bedeutet. Der Zelltod kann hierbei durch Nekrose oder durch Apoptose bedingt sein. Am stärksten war dieser Effekt in BON1-, QGP1- und H727-Zellen bei 60 μM AR-A014418 bzw. in GOT1-Zellen bei 20 μM ausgeprägt [1].

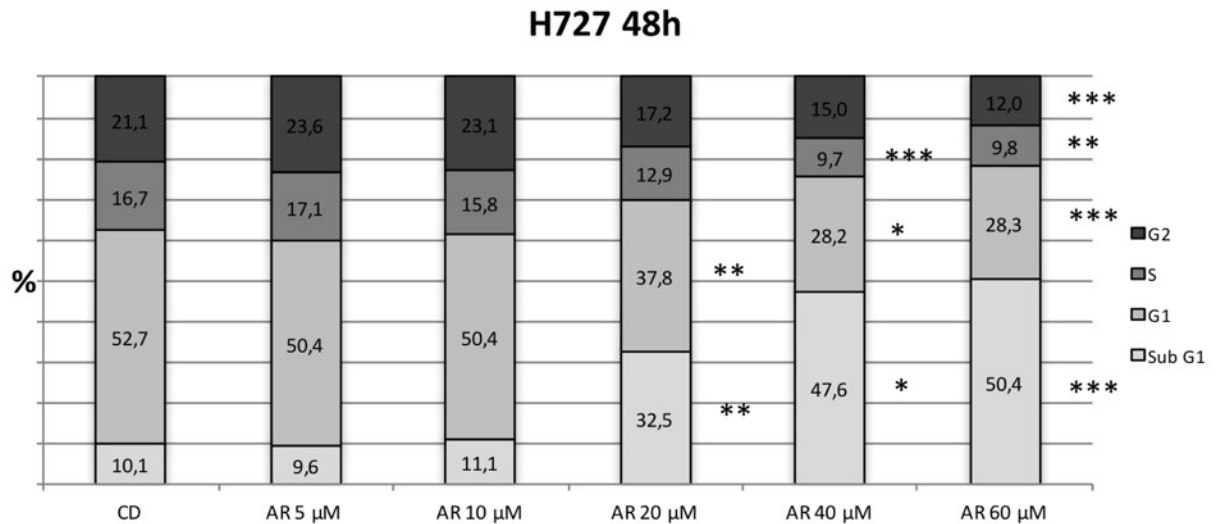
Gleichzeitig kam es zu einer statistisch signifikanten Abnahme aller Zelllinien in der G1-Phase, der Effekt war hierbei in der Stärke antiproportional zu der Zunahme in der Sub-G1-Phase [1].

In H727- und GOT1-Zellen kam es zudem zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Zellpopulationen in der S- und G2/M-Phase nach 48 h (s. Anhang Tabellen 15 und 16). Der Effekt war in GOT1-Zellen am stärksten bei einer 20 μM AR-A014418-Vorbehandlung ausgeprägt, in H727-Zellen war die Abnahme in der S-Phase am stärksten bei 40 μM und in der G2/M-Phase am stärksten bei 60 μM zu beobachten. Insgesamt waren die Effekte jedoch nur gering, alle Werte sind Abbildungen 27 – 30 zu entnehmen [1].



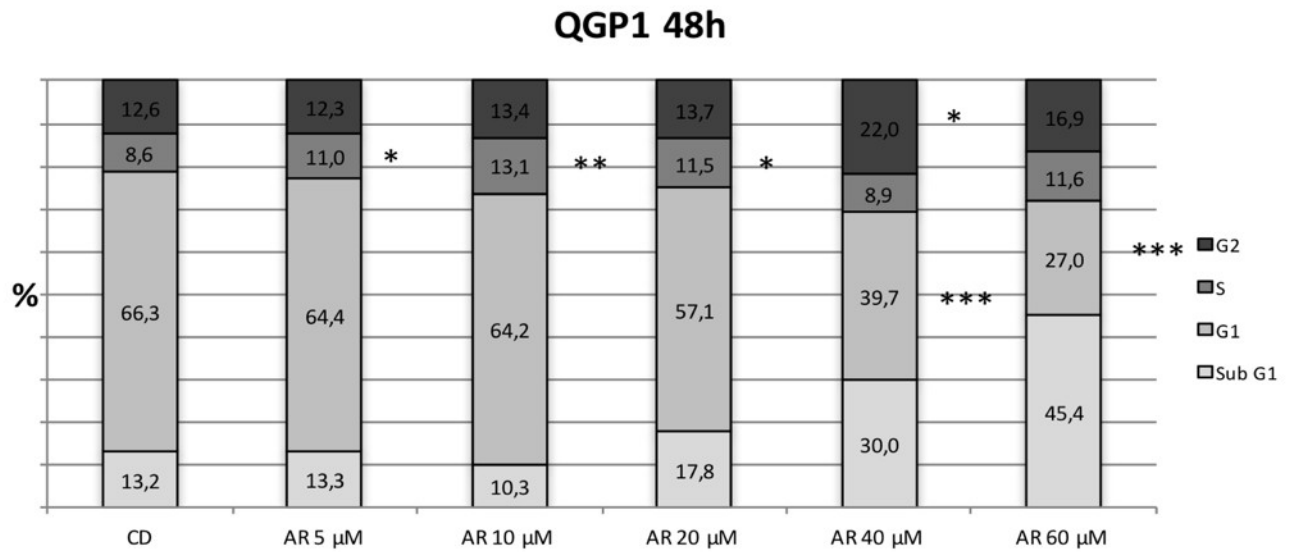
(AR = AR-A014418, CD = DMSO-Kontrolle)

Abbildung 28: FACS-Analyse BON1-Zellen nach AR-A014418-Gabe [1]. In BON1-Zellen zeigte sich ab einer AR-A014418-Konzentration von 20 μM eine statistisch signifikante Zunahme von Zellen in der SubG1-Phase, antiproportional hierzu fiel die Fraktion in der G1-Phase [1].



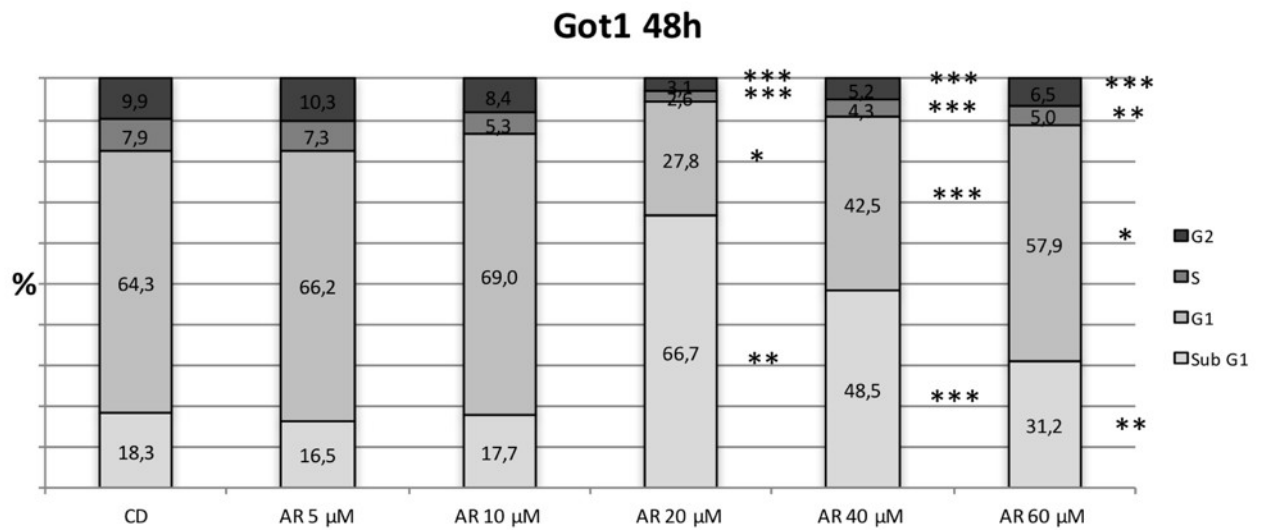
(AR = AR-A014418, CD = DMSO-Kontrolle)

Abbildung 29: FACS-Analyse H727-Zellen nach AR-A014418-Gabe [1]. In H727-Zellen zeigte sich ab einer AR-A014418-Konzentration von 20 µM eine statistisch signifikante Zunahme von Zellen in der SubG1-Phase, antiproportional hierzu fiel die Fraktion in der G1-Phase. Zudem kam es zu einer leichten Abnahme von Zellen in der S- und G2/M-Phase ab einer AR-A014418-Behandlung mit 40 µM bzw. 60 µM [1].



(AR = AR-A014418, CD = DMSO-Kontrolle)

Abbildung 30: FACS-Analyse QGP1-Zellen nach AR-A014418-Gabe [1]. In QGP1-Zellen zeigte sich ab einer AR-A014418-Konzentration von 40 µM eine statistisch signifikante Zunahme von Zellen in der SubG1-Phase, antiproportional hierzu fiel die Fraktion in der G1-Phase [1].



(AR = AR-A014418, CD = DMSO-Kontrolle)

Abbildung 31: FACS-Analyse GOT1-Zellen nach AR-A014418-Gabe [1]. In GOT1-Zellen zeigte sich ab einer AR-A014418-Konzentration von 20 µM eine statistisch signifikante Zunahme von Zellen in der SubG1-Phase, antiproportional hierzu fiel die Fraktion in der G1-Phase. Zudem kam es zu einer leichten Abnahme von Zellen in der S- und G2/M-Phase ab einer AR-A014418-Behandlung mit 20 µM [1].

4.6) Caspase-Assay

In den durchgeführten Caspase-Assays konnte in QGP1-, H727- und GOT1-Zellen nach 144 h und 20 µM AR-A014418-Behandlung eine statistisch signifikante Zunahme der Caspase 3- und 7-Aktivität beobachtet werden, was den Zelltod durch Apoptose anzeigt (s. Abbildung 32). In H727- und GOT1-Zellen konnte zudem auch nach 72 h eine statistisch signifikant Apoptose-Induktion beobachtet werden (s. Abbildung 33) [1].

In BON1-Zellen hingegen fiel die Caspase 3- und 7-Aktivität nach 72 h und einer Konzentration von 10 µM AR-A014418 statistisch signifikant ab (s. Abbildung 33). Es kam in BON1-Zellen gleichzeitig zu einer Erhöhung der light chain 3A (LC3A) II-Expression als Hinweis auf Autophagie (s. Abbildung 31) [1].

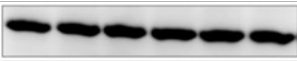
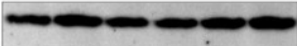
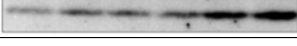
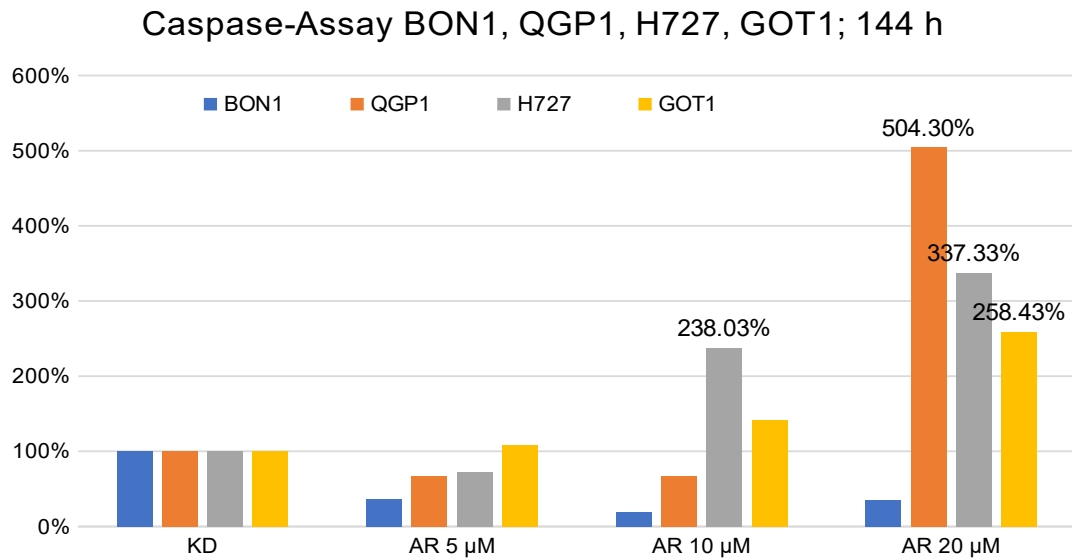
	BON1	
Actin		48 h
LC3AI		
LC3AII		
	20 µM AR	
	15 µM AR	
	10 µM AR	
	5 µM AR	
	DMSO-Kontrolle	
	Kontrolle	

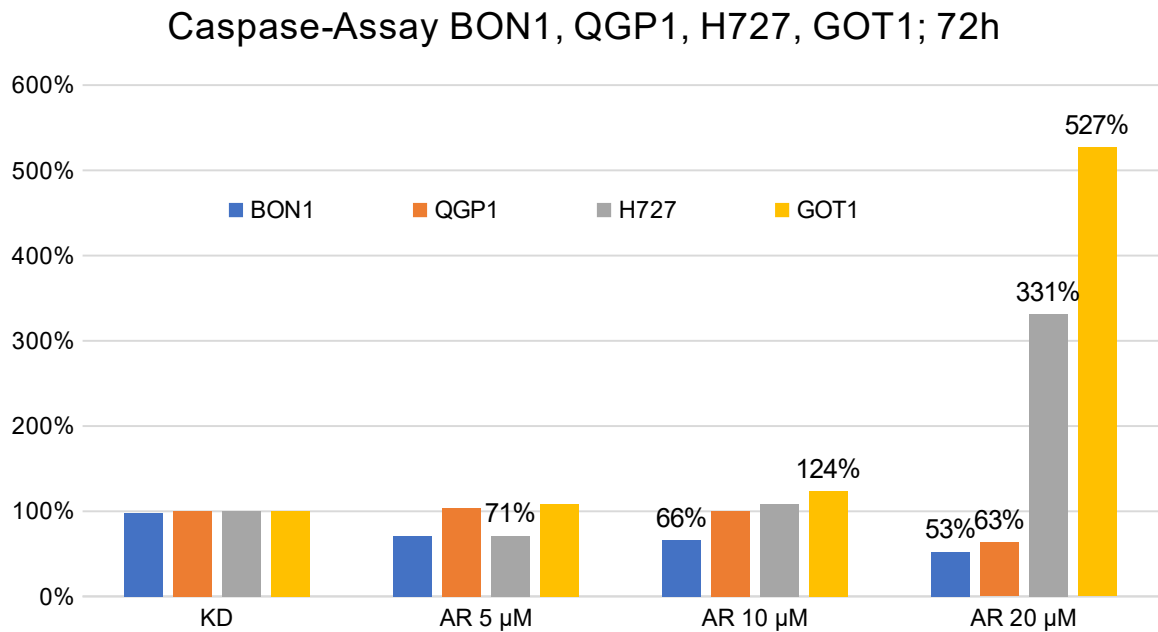
Abbildung 32: *Western Blot von LC3AII in BON1-Zellen [1].* Ab einer Konzentration von 15 µM AR-A014418 kam es zu einer Erhöhung von LC3AII in BON1-Zellen nach 48 h [1]. Als Ladungskontrolle wird β-Actin gezeigt [1].

Interessanterweise konnte auch in QGP1-Zellen zunächst ein statistisch signifikanter Rückgang der Caspase 3- und 7-Aktivität nach 72 h und einer AR-A014418-Behandlung mit 20 µM beobachtet werden (s. Abbildung 33). Die genauen Werte der Caspasen nach einer AR-A014418-Behandlung mit Konzentrationen von 5 µM – 20 µM nach 72 h und nach 144 h sind der Tabelle 15 und der Tabelle 16 im Anhang für alle vier untersuchten Zelllinien zu entnehmen [1].



(AR = AR-A014418, KD = DMSO-Kontrolle)

Abbildung 33: *Caspase-Assay nach 144 h AR-A014418-Inkubation* [1]. Es zeigte sich in QGP1-, H727- und GOT1-Zelle nach 144 h und einer AR-A014418-Behandlung mit 20 µM ein statistisch signifikanter Anstieg der Caspasen 3 und 7, was den Zelltod durch Apoptose anzeigt. In H727-Zellen konnte zudem auch bei einer AR-A014418-Konzentration von 10 µM eine statistisch signifikante Zunahme der Caspasen 3 und 7 beobachtet werden [1].



(AR = AR-A014418, KD = DMSO-Kontrolle)

Abbildung 34: *Caspase-Assay nach 72 h AR-A014418-Inkubation [1].* Es zeigte sich in H727- und GOT1-Zellen nach 72 h und einer AR-A014418-Behandlung mit 5 µM und 20 µM bzw. 10 µM und 20 µM ein statistisch signifikanter Anstieg der Caspasen 3 und 7, was den Zelltod durch Apoptose anzeigt. In BON1- und QGP1-Zellen kam es hingegen zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Caspasen 3 und 7 nach einer Behandlung mit AR-A014418 von 10 µM und 20 µM bzw. 20 µM [1].

4.7) Zellzyklusproteine und Rezeptor-Tyrosinkinasen

P53, eines der wichtigsten proapoptotischen Proteine der Zelle, fiel in BON1- und H727-Zellen nach 48 h und AR-A014418-Konzentrationen ab 10 μ M ab (s. Abbildung 34). In QGP1- und GOT1-Zellen kam es zu keiner Veränderung in der p53-Expression (s. Abbildung 34).

	BON1	QGP1	H727	GOT1	
Actin					48 h
p53					
p27 ^{Kip1}					
p21 ^{Cip1}					
	20 μ M AR 15 μ M AR 10 μ M AR 5 μ M AR DMSO-Kontrolle Kontrolle	20 μ M AR 15 μ M AR 10 μ M AR 5 μ M AR DMSO-Kontrolle Kontrolle	20 μ M AR 15 μ M AR 10 μ M AR 5 μ M AR DMSO-Kontrolle Kontrolle	20 μ M AR 15 μ M AR 10 μ M AR 5 μ M AR DMSO-Kontrolle Kontrolle	

Abbildung 35: *Western Blot von Proteinen der Apoptose.* In BON1- und H727-Zellen kam es zu einem Abfall von p53, in QGP1- und GOT1-Zellen konnten keine relevanten Veränderungen beobachtet werden bei keiner der getesteten AR-A014410-Konzentrationen nach 48 h. In BON1- und H727-Zellen kam es zu einem Abfall von p27^{Kip1}, in QGP1- und GOT1-Zellen kam es zu keiner relevanten Veränderung. p21^{Cip1} fiel in BON1- und QGP1-Zellen ab, in H727- und GOT1-Zellen stieg es hingegen an. Als Ladungskontrolle wird β -Actin gezeigt [1].

Die Western Blot-Analysen zeigten des Weiteren einen Abfall des antiapoptotisch wirkenden Proteins Bcl-2 in H727-Zellen, in BON1-Zellen zeigte sich hingegen eine Zunahme (s. Abbildung 35 und Anhang Abbildung 32). In QGP1- und GOT1-Zellen konnten keine relevanten Veränderungen beobachtet werden (s. Abbildung 35 und Anhang Abbildung 32) [1].

	BON1	QGP1	H727	GOT1	
--	------	------	------	------	--






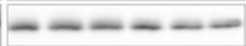


Actin					48 h
Bcl2					
20 µM AR 15 µM AR 10 µM AR 5 µM AR DMSO-Kontrolle Kontrolle					

Abbildung 36: *Western Blot von Bcl2.* In BON1-Zellen zeigte sich eine Zunahme von Bcl-2, in H727-Zellen fiel es hingegen ab. In QGP1- und GOT1-Zellen zeigte sich keine Veränderung bei keiner der getesteten Konzentrationen in den Western Blots nach 48 h. Als Ladungskontrolle wird β -Actin gezeigt [1].

Das proapoptotische Protein $p27^{Kip1}$ fiel in BON1-Zellen ab einer AR-A014418-Konzentration von 5 μ M ab (s. Abbildung 34). Auch in H727-Zellen kam es bis AR-A014418-Konzentrationen von 15 μ M zu einem Abfall von $p27^{Kip1}$, bei 20 μ M konnte ein unverändertes Niveau beobachtet werden, in QGP1- und GOT1-Zellen konnten keine relevanten Veränderungen beobachtet werden (s. Abbildung 34).

Das proapoptotische Protein $p21^{Cip1}$ fiel in BON1- und QGP1-Zellen ab AR-A014418-Konzentrationen von 5 μ M ab, in H727- und GOT1-Zellen stieg es hingegen an, deutlich zu sehen ab einer Konzentration von 15 μ M (s. Abbildung 34).

Das Zellzyklusprotein Cyclin D3 wurde in BON1- und QGP1-Zellen nach einer AR-A014418-Behandlung ab 5 μ M und in H727-Zellen ab einer AR-A014418-Konzentration von 15 μ M vermindert exprimiert, in GOT1-Zellen stieg es hingegen nach 48 h und 20 μ M AR-A014418 an (s. Abbildung 12 und Anhang Abbildung 33) [1].

Cyclin D1 fiel ebenfalls nach 48 h in BON1-, QGP1- und H727-Zellen ab mit stärkster Ausprägung bei 20 μ M AR-A014418 (s. Abbildung 36). Es zeigte sich jedoch nur eine geringe Expression in QGP1-Zellen, in GOT1-Zellen wurde bereits eine fehlende Cyclin D1-Expression beschrieben [357] (s. Abbildung 36).

		BON1	QGP1	H727	
20 μ M AR	Actin				48 h
15 μ M AR					
10 μ M AR	Cyclin D1				
5 μ M AR					
DMSO-Kontrolle					
Kontrolle					
20 μ M AR					
15 μ M AR					
10 μ M AR					
5 μ M AR					
DMSO-Kontrolle					
Kontrolle					
20 μ M AR					
15 μ M AR					
10 μ M AR					
5 μ M AR					
DMSO-Kontrolle					
Kontrolle					
20 μ M AR					
15 μ M AR					
10 μ M AR					
5 μ M AR					
DMSO-Kontrolle					
Kontrolle					

Abbildung 37: Western Blot von Cyclin D1. Es zeigte sich nach 48 h und einer AR-A014418-Behandlung in BON1-Zellen ab 10 μ M, in QGP1-Zellen ab 15 μ M und in H727-Zellen ab 5 μ M ein Abfall von Cyclin D1. Als Ladungskontrolle wird β -Actin gezeigt [1].

Die Checkpoint-Kinase1 (Chk1) wurde in BON1-, QGP1- und H727-Zellen durch eine AR-A014418-Behandlung aktiviert/phosphoryliert (pChk1) mit dem deutlichsten Anstieg in H727-Zellen bei 20 μ M AR-A014418, in GOT1-Zellen wurde sie nach 48 h hingegen ab 5 μ M AR-A014418 gehemmt (s. Abbildung 12 und Anhang Abbildungen 34 – 37) [1].

Rezeptor-Tyrosinkinasen

Die Rezeptor-Tyrosinkinase EGFR wurde in allen vier untersuchten Zelllinien nach 48 h und ab 5 μ M AR-A014418 gehemmt/dephosphoryliert, am stärksten war der Effekt bei einer Konzentration von 20 μ M zu beobachten (s. Abbildung 12 und Anhang Abbildung 38) [1].

IGF1R, ebenfalls eine Rezeptor-Tyrosinkinase, wurde in BON1- und QGP1-Zellen nach 48 h ab AR-A014418-Konzentrationen von 5 μ M dephosphoryliert/gehemmt, in H727-Zellen kam es ab einer Konzentration von 10 μ M zu einer Hemmung (s. Abbildung 37). Am stärksten war dieser Effekt in BON1-Zellen bei einer Konzentration von 20 μ M zu beobachten, in GOT1-Zellen konnte kein Effekt der AR-A014418-Behandlung auf IGF1R festgestellt werden (s. Abbildung 37).

	BON1	QGP1	H727	GOT1	
Actin					
pIGF1R Y1135					48 h
IGF1R					

Abbildung 38: *Western Blot von IGF1R.* Nach 48 h ließ sich ab einer AR-A014418-Behandlung mit 5 μ M in BON1- und QGP1-Zellen und ab einer 10 μ M AR-A014418-Behandlung in H727-Zellen eine Hemmung des IGF1R beobachten, in GOT1-Zellen zeigte eine GSK3-Hemmung keinen Effekt. Als Ladungskontrolle wird β -Actin gezeigt [1].

5) Diskussion

Antitumorale Effekte von AR-A014418 in Neuroendokrinen Tumorzelllinien

In dieser Forschungsarbeit wurden die Effekte des spezifischen GSK3 α/β -Inhibitors AR-A014418 in humanen NET-Zelllinien evaluiert, um neue Erkenntnisse über die zellulären Signalwege, die Bedeutung der GSK3 sowie sich hieraus ableitender neuer therapeutischer Strategien zu gewinnen. Die GSK3 spielt eine nicht eindeutige Rolle bei der Entstehung von Krebs, sie kann je nach zellulärem Kontext wachstumshemmend oder -fördernd auf verschiedene Tumorzellen wirken [1][110, 194].

In allen vier von uns untersuchten NET-Zelllinien zeigte sich eine statistisch signifikante dosis- und zeitabhängige Reduktion der Zellproliferation durch die GSK3 α/β -Hemmung mit eindeutig stärkeren Effekten nach einer längeren Inkubationszeit von 144 h. Die hohen Dosen können hierbei möglicherweise durch die längere Inkubationszeit bei gleichbleibendem Effekt reduziert werden [1].

Eine GSK3 α/β -Hemmung hat bereits *in vitro* [117, 118, 122] und *in vivo* [116, 124, 332] Antitumorpotenzial in NET und anderen Tumorentitäten gezeigt. Die von uns *in vitro* ermittelten IC₅₀-Werte für AR-A014418 scheinen hoch, andere Arbeitsgruppen fanden jedoch gleiche Wirkbereiche von AR-A014418 ($\geq 5 \mu\text{M}$) für eine signifikante Reduktion des Zellüberlebens *in vitro* [117, 358, 359]. In all unseren Experimenten zeigten sich in einem Konzentrationsbereich von $5 \mu\text{M}$ – $20 \mu\text{M}$ AR-A014418 signifikante Ergebnisse. Es werden aber scheinbar auch hohe Dosen von GSK3-Inhibitoren vertragen, so wurde in der ersten Phase I-Studie mit dem potenten GSK3 α/β -Inhibitor LY2090314 Patienten bis zu 120 mg/d gegeben [360]. Ab Dosen von 40 mg/d traten vermehrt Thoraxschmerzen und Störungen des Sehens auf [360].

Auch bei Lithium, einem seit Jahrzehnten zugelassenen Medikament zur Therapie bipolarer Störungen [361], werden sehr hohe Dosen (450 mg/d bis 1200 mg/d) (NCT02198859) und Blutplasmakonzentrationen (0,6 mM – 1,2 mM) toleriert [362]. Trotz der Tolerabilität von Lithium in sehr hohen und LY2090314 in hohen Dosen muss die klinische Relevanz von AR-A014418 im Hinblick auf die hohen benötigten Dosen noch evaluiert werden [1].

Die GSK3 besitzt zwei Isoformen α und β , hierbei sind die Funktionen der GSK3 β wesentlich besser untersucht. In unseren Zellen zeigte sich eine volle α -Hemmung bereits nach 2 h und ab $5 \mu\text{M}$ AR-A014418, eine volle GSK3 β -Hemmung hingegen

erst nach 48 h und 10 μM in GOT1- und BON1-Zellen, in H727-Zellen ab 20 μM und in QGP1-Zellen blieb die β -Hemmung nach 48 h sogar vollständig aus [1].

Die Konzentrationen, bei denen die GSK3 α und die GSK3 β gehemmt waren, entsprachen etwa unseren IC₅₀-Konzentrationen, wobei GOT1-Zellen am sensibelsten auf die GSK3-Hemmung reagierten – gefolgt von BON1-Zellen. Die vollständige GSK3 β -Hemmung schon bei niedrigeren Dosen in GOT1- und BON1-Zellen im Vergleich zu den anderen von uns untersuchten Zelllinien kann eine Teilerklärung für ihre höhere Sensibilität gegenüber AR-A014418 sein [1].

Die Hemmung der GSK3 β wurde in den Westernblots nach 48 h untersucht, die IC₅₀-Konzentration für die Zellproliferation wurde hingegen erst nach 144 h bestimmt. Dies liegt darin begründet, dass auf Proteinebene bereits früher die Anpassungen der Zelle zu sehen sind, welche wiederum Veränderungen auf Signalwegebene verursachen und sich folglich auf das Zellüberleben auswirken können. Insbesondere an Wachstumsfaktorrezeptoren zeigen sich gewöhnlich bereits nach kurzen Inkubationszeiten eindeutige Reaktionen [1].

Beide GSK3-Isoformen besitzen spezifische Rollen und Funktionen [194] und erst durch die Hemmung beider konnte ein volles Zellansprechen erreicht werden. Die Hemmung der Zellproliferation trotz Ausbleiben einer β -Hemmung in QGP1-Zellen lässt jedoch vermuten, dass die alleinige Inhibierung der GSK3 α auch bereits einen therapeutischen Effekt im Sinne eines Antitumorpotenzials entfalten könnte, wenn auch einen geringeren. In Neuroblastomzellen wurde ebenfalls durch eine alleinige α -Hemmung mit Konzentrationen bis zu 20 μM AR-A014418 eine verringerte Zellproliferation beobachtet [125]. Da die GSK3 α -Hemmung bereits nach 2 h voll ausgeprägt war, sich eine GSK3 β -Hemmung jedoch erst nach 48 h zeigte, kann möglicherweise eine noch längere Inkubationszeit eine GSK3 β -Hemmung bereits bei niedrigeren Konzentrationen als 10 μM AR-A014418 bewirken [1].

Die genauen Rollen der GSK3 α und der GSK3 β sowie die genaue Wirkung von GSK3-Inhibitoren auf die einzelnen Isoformen in NET und anderen Tumorentitäten bleiben ein interessantes Forschungsgebiet und sind bis dato nicht ausreichend verstanden.

Glykogensynthase-Kinase 3 und NOTCH

NOTCH ist ein stark konservierter Signaltransduktionsweg [253], der je nach Tumorentität und zellulärem Kontext tumorsuppressiv [363] oder onkogen wirken [256, 364, 365] kann. In gastroenteropankreatischen [366] und bronchopulmonalen

[367] NET wurde NOTCH1 als Tumorsuppressor vorgeschlagen [368], in rektalen NET hingegen als Tumorpromotor [369].

In BON1- und H727-Zellen konnte gezeigt werden, dass eine NOTCH1-Verstärkung mit einer verminderten Zellproliferation einhergeht [123, 366, 367, 370, 371].

Die GSK3 kann NOTCH1 stabilisieren [104, 117, 219, 289, 303].

Ob eine verminderte NOTCH-Aktivität aufgrund der GSK3-Hemmung zu den hohen Konzentrationsbereichen von AR-A014418 beigetragen hat und welche Rolle die GSK3-Isoformen α und β genau haben, muss noch untersucht werden. Auch wie sich eine mögliche therapeutische GSK3-Hemmung auf den NOTCH-Signalweg in NET auswirkt und welche Limitierungen oder Vorteile sich hieraus eventuell ergeben, ist bisher nicht ausreichend verstanden und wurde in der hier vorgelegten Arbeit nicht untersucht.

Kombinationsgabe von AR-A014418 plus Everolimus

Es besteht ein Crosstalk zwischen GSK3- und mTOR-Signalwegen in der Tumorzelle, wie aktuell in einer Übersichtsarbeit von Evangelisti et al. dargestellt [372].

Vor diesem Hintergrund erfolgte die Kombinationsgabe von AR-A014418 plus Everolimus.

In den NET-Tumorzelllinien war eine Hemmung der mTORC1-Effektorproteine S6, p70S6K und 4EBP1 in BON1-, QGP1- und H727-Zellen ab Konzentrationen von $\geq 10 \mu\text{M}$ AR-A014418 zu beobachten, weshalb wir den mTORC1-Inhibitor Everolimus mit

AR-A014418 kombinierten um eine frühere Hemmung der genannten Targets zu bewirken. In GOT1-Zellen war eine deutliche Hemmung der mTORC1-Effektorproteine bereits ab $5 \mu\text{M}$ AR-A014418 zu beobachten, was zu der höheren Sensibilität von GOT1-Zellen beitragen könnte [1].

Everolimus verhindert über die mTORC1-Hemmung eine Aktivierung von 4EBP1 und p70S6K [353, 373] und ist bereits zur Therapie von pankreatischen [58] sowie gastrointestinalen und bronchopulmonalen NET [56] zugelassen. In all unseren Experimenten wurde Everolimus in therapeutisch relevanten Dosen verwendet [1][374-376].

Bei alleiniger AR-A014418-Gabe zeigte sich in den untersuchten NET-Tumorzelllinien eine wesentlich schwächer ausgeprägte Zellproliferationshemmung im Vergleich zu der Einzelgabe von Everolimus, der hemmende Effekt von AR-

A014418 auf mTORC1 und dessen Effektorproteine scheint also nicht stark genug zu sein, um die gleiche Wirkung wie Everolimus zu erzielen [1].

Die Kombination der beiden Substanzen Everolimus und AR-A014418 zeigte in den untersuchten NET-Tumorzelllinien nur einen additiven Effekt bei niedrigen Konzentrationen und sogar einen antagonistischen Effekt bei höheren Konzentrationen in allen drei untersuchten Zelllinien. Eine 4EBP1- und S6-Hemmung nach AR-A014418-Gabe sowie ein antagonistischer Effekt bei gleichzeitiger mTORC1- und GSK3-Hemmung wurde ebenfalls in Nierenzellkarzinomzellen beobachtet [359]. Die antagonistische Wirkung wurde durch eine kompetitive Hemmung von p70S6K und 4EBP1 erklärt, da sie gemeinsame Zielsubstrate der GSK3 und von mTORC1 sind [359]. Ein weiterer Grund für einen fehlenden additiven Effekt der AR-A014418/Everolimus-Kombination könnte eine ebenso starke GSK3-Hemmung nach alleiniger AR-A014418-Gabe wie nach AR-A014418/Everolimus-Kombinationstherapie sein [1][377].

Zudem entfällt durch die p70S6K-Hemmung aufgrund der GSK3- und mTORC1-Hemmung ein wichtiger negativer Feedback-Mechanismus der Zelle auf den PI3K/Akt/mTOR1-Weg [170, 194] (s. „PI3K/Akt/mTORC1-Signalweg“) und es kommt unter Everolimus- [147, 353, 378] und AR-A014418-Gabe zu einer verstärkten Akt-Aktivierung. Die Aktivierung des gleichen Escape-Mechanismus kann eine weitere Erklärung sein, wie die Zelle einen kombinierten hemmenden Effekt kompensieren kann [1].

Eine verstärkte Akt-Aktivierung durch die GSK3-Hemmung konnte tatsächlich bei suboptimalen Dosen und kurzer Inkubationszeit bei AR-A014418-Einzelgabe in allen vier Zelllinien beobachtet werden; in BON1-, QGP1- und GOT1-Zellen kam es zusätzlich zu einer ERK-Aktivierung. Dieser Mechanismus kann die Erklärung für die vorübergehende Zunahme der Zellproliferation in QGP1-Zellen bei geringen AR-A014418-Konzentrationen sein [1].

Eine kompensatorische Aktivierung des Akt- und des Raf1/MEK/ERK-Signalweges als Antwort auf eine mTORC1- oder GSK3-Hemmung wurde bereits in Zelllinien anderer NET [378, 379] und Tumorentitäten [176, 358, 380] beschrieben.

Kombinationsgabe von AR-A014418 plus Lovastatin

Aus der kompensatorischen Akt- und ERK-Aktivierung der Zelle als Antwort auf die GSK3-Hemmung ergab sich die Rationale, dies durch kombinierte Gabe von AR-A014418 und Lovastatin zu verhindern. Lovastatin ist ein HMG-CoA-Reduktase-

Inhibitor, der Akt und Erk hemmt und bereits in verschiedenen NET-Zelllinien *in vitro* und *in vivo* Antitumorpotenzial gezeigt hat [1][336-338, 381].

Serumspiegel von Lovastatin werden bis zu 12,3 μM ohne toxische Nebenwirkungen vom Menschen vertragen, die Gabe von 10 μM Lovastatin in unseren Experimenten ist somit potenziell eine therapeutisch relevante Dosis [382]. In unseren Versuchen zeigte sich nach Kombinationsgabe von Lovastatin und AR-A014418 in BON1- und QGP1-Zellen ein synergistischer und in H727-Zellen ein additiver Effekt. Die durch alleinige AR-A014418-Gabe induzierte Akt- und ERK-Aktivierung konnte effektiv verhindert werden, was in den Western Blots bestätigt werden konnte. Der fehlende Synergismus in H727-Zellen kann durch die spätere kompensatorische Akt-Aktivierung ($\text{AR-A014418} \geq 20 \mu\text{M}$) sowie die fehlende Aktivierung von ERK erklärt werden. Die H727-Zellen reagierten hierdurch möglicherweise weniger vulnerabel auf die zusätzliche Akt- und ERK-Inhibierung als BON1- und QGP1-Zellen. Der beobachtete synergistische Effekt war in QGP1-Zellen jedoch nur gering ausgeprägt und eine klinische Relevanz ist somit fraglich [1].

Die Kombination AR-A014418 und Lovastatin scheint aber ein interessanter Angriffspunkt für weitere Untersuchungen auch *in vivo* zu sein [1].

Kombinationsgabe von AR-A014418 plus 5-FU

Um mögliche chemosensibilisierende Eigenschaften von AR-A014418 in NET zu untersuchen, kombinierten wir es mit 5-FU [1].

5-Fluoropyrimidin-Deivate wie 5-FU oder Capecitabin sind Standardchemotherapeutika und werden in Kombination mit Streptozotocin oder Temozolomid zur Behandlung von metastasierten pankreatischen oder bronchopulmonalen NET eingesetzt [356].

Die Kombination AR-A014418 plus 5-FU zeigte in QGP1-Zellen einen synergistischen und in BON1- und H727-Zellen einen additiven Effekt. In Pankreasadenokarzinomen bzw. Nierenzellkarzinomen konnte für die Kombination von AR-A014418 mit den Chemotherapeutika Gemcitabin bzw. Docetaxel ebenfalls ein synergistischer Effekt *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden [1][115, 383]. AR-A014418 besitzt somit vielversprechende chemosensibilisierende Eigenschaften, die sich in Kombinationstherapien zunutze gemacht werden könnten. Interessant ist dies möglicherweise auch im Hinblick auf die Therapie von gut differenzierten ilealen NET, welche als relativ chemoresistent gelten [1][384].

Interessanterweise konnten wir in GOT1- und QGP1-Zellen eine GSK3-Überexpression zeigen, die in vorangegangenen Studien mit einer erworbenen

Chemoresistenz in Verbindung gebracht wurde [383, 385]. Somit kann dies eine Erklärung für den in QGP1-Zellen beobachteten Synergismus sein [1].

Die Untersuchung von AR-A014418 in Kombination mit 5-FU – insbesondere in GOT1-Zellen in Hinblick auf die Chemoresistenz von gut differenzierten ilealen NET – ist möglicherweise ein vielversprechendes Ziel. Die Übertragbarkeit der Beobachtungen *in vitro* auf das Tumorgewebe von Patienten muss jedoch selbstverständlich noch kritisch geprüft werden [1].

Zellmigration

Die GSK3 spielt eine komplexe, kontextabhängige Rolle in der Regulierung von Migration, Adhäsion und Proliferation einer Zelle [95, 101, 233, 386]. Eine lokale GSK3-Hemmung in der Zelle soll migrationsverstärkend, eine total-zelluläre GSK3-Hemmung hingegen migrationshemmend wirken [387]. In allen drei von uns untersuchten Zelllinien konnte eine verminderte Zellmigration durch die GSK3-Hemmung festgestellt werden, wie dies auch bereits in Pankreaskarzinom- [115], Glioblastom- [388] und Ösophaguskarzinomzellen [389] beschrieben wurde [1].

Über den kanonischen Wnt-Weg führt eine GSK3-Aktivierung zu einer proteasomalen Degradation von β -Catenin durch Ubiquitinierung [194, 229, 390]. Zudem wird β -Catenin durch die GSK3 über den NOTCH-Signalweg negativ reguliert [289, 290, 391]. Somit wäre mit einer Erhöhung von β -Catenin als Folge der GSK3-Hemmung wie bspw. in Hepatozyten [219] beobachtet, zu erwarten. Die GSK3 kann aber auch zur Stabilisierung von β -Catenin beitragen [194]. Letzterer Effekt scheint in den von uns untersuchten Zelllinien BON1, QGP1 und H727 zu überwiegen, denn es kam zu einer Reduktion von β -Catenin nach AR-A014418-Behandlung wie bereits in Neuroblastomzellen beobachtet [125].

Dies kann eine Erklärung für die verminderte Zellmigration unserer Zellen durch die GSK3-Hemmung sein, denn eine β -Catenin-Akkumulation kann die Migrationsfähigkeit einer Zelle über die Wirkung auf migrationsfördernde Faktoren verstärken [392, 393].

Aktiviertes β -Catenin kann die Bildung von Metastasen fördern [394, 395], sodass eine verminderte β -Catenin-Expression möglicherweise auf ein verringertes Metastasierungspotenzial unserer Zellen durch die GSK3-Hemmung hinweist [1].

Ein weiterer Mechanismus, über den die verminderte Zellmigration der untersuchten NET-Tumorzelllinien möglicherweise erklärt werden kann, ist der Abfall von p27^{Kip1} durch die GSK3-Hemmung in BON1- und H727-Zellen. p27^{Kip1} ist ein

Zellzyklusregulatorprotein der Zelle, das aber auch zellzyklusunabhängige Funktionen besitzt. So hat es zellmigrationsfördernde Eigenschaften, weshalb ein Abfall von p27^{Kip1} hemmend auf die Zellmigration wirken kann, wie bereits in Brustkrebszellen gezeigt wurde [396, 397]. Auf der anderen Seite ist ein p27^{Kip1}-Verlust der Zelle in gastroenteropatischen NET mit einer schlechten Prognose verbunden [398], weshalb die genauen Auswirkungen des p27^{Kip1}-Abfalls unter der GSK3-Hemmung noch kritisch evaluiert werden müssen.

In QGP1-Zellen ist der Effekt der Migrationshemmung durch AR-A014418-Behandlung nur gering ausgeprägt, weshalb eine klinische Relevanz fraglich ist.

Bestrahlung

Es wurde bereits eine protektive Wirkung der GSK3-Hemmung auf neuronales Gewebe gegenüber γ -Strahlung beschrieben [399-401], auch kann eine Aktivierung von Akt zu einer Radioresistenz der Zellen führen [340]. Auf der anderen Seite konnte in Pankreaskrebszellen [115] eine Radiosensibilisierung durch eine GSK3-Hemmung gezeigt werden, weshalb wir in BON1-, QGP1- und H727-Zellen den Effekt von γ -Strahlung auf das Zellwachstum nach einer AR-A014418-Behandlung untersuchten. GOT1-Zellen konnten aufgrund ihrer langsamen Wachstumsgeschwindigkeit nicht untersucht werden [1].

In den untersuchten NET-Tumorzelllinien kam es zu keiner Radioresistenzbildung durch die GSK3-Hemmung [1] oder der ihr folgenden reaktiven Akt-Aktivierung, im Gegenteil wirkte sich die AR-A014418-Vorbehandlung sogar tendenziell gering radiosensibilisierend vor allem auf QGP1-Zellen aus [1]. In H727-Zellen zeigte sich kein statistisch signifikanter Effekt [1].

In der Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 wurden widersprüchliche Ergebnisse durch eine GSK3-Hemmung auf die Strahlensensibilität berichtet, Kitano et al. beobachteten einen radiosensibilisierenden Effekt [115], wohingegen Watson et al. einen radioprotektiven Effekt feststellten [402]. Dies zeigt, wie ungewiss die genaue Rolle der GSK3 in Bezug auf das Zellüberleben bei Bestrahlung ist.

Unsere Ergebnisse lassen aber zumindest vermuten, dass eine GSK3-Hemmung den Therapieerfolg einer Radiotherapie bei NET nicht einschränkt [1].

Zellzykluskomponenten

MTORC1 und p70S6K sind wichtige Regulatorproteine des proliferativen PI3K/Akt/mTORC1-Weges, deren Regulierung in der Einleitung bereits genauer erläutert wurde. Eine GSK3-Hemmung führte, wie in den Ergebnissen „Kombinationsbehandlung AR-A014418 plus Everolimus“ beschrieben, zu einer mTORC1-/p70S6K-Hemmung. Als Konsequenz dieser Hemmung kann es wiederum zu einer verminderten Expression der Zellzykluskomponenten Cyclin D1 und Cyclin D3 kommen [403]. Die Mechanismen sind hierbei komplex und können u.a. über die verminderte Transkription von NF- κ B vermittelt werden [220, 297]. Aber auch die GSK3-Hemmung kann direkt zu einer verminderten Aktivierung von zellwachstumsfördernden Signalwegen wie NOTCH führen [273, 289]. Eine verringerte Cyclin D1- und D3-Expression zeigte sich bei uns in BON1-, QGP1- und H727-Zellen in Folge der GSK3-Hemmung. In Pankreaskarzinomzellen [115] und Neuroblastomzellen [125] wurde ebenfalls eine verringerte Cyclin D1-Expression durch eine GSK3-Hemmung beobachtet. Zudem könnte die in unseren Zellen beobachtete verringerte β -Catenin-Expression in Folge der GSK3-Hemmung zusätzlich zu dem Abfall von Cyclin D1 beitragen, denn auch β -Catenin aktiviert die Transkription von Cyclin D1, wie in der Einleitung unter „Wnt-Signalweg“ bereits beschrieben [1][194, 250, 251].

Die Abnahme von Cyclin D1 durch die GSK3-Hemmung ist wahrscheinlich Teil der antiproliferativen Wirkung von AR-A014418, denn in der Mehrzahl von pankreatischen NET wurde eine verstärkte Expression von Cyclin D1 beobachtet [404, 405].

In der sensibelsten Zelllinie GOT1 konnte im Gegensatz zu den drei anderen untersuchten Zelllinien ein Anstieg von Cyclin D3 bei 20 μ M AR-A014418 als Antwort auf die GSK3-Hemmung beobachtet werden. Cyclin D1 ist in GOT1-Zellen, wie bereits kürzlich beschrieben, kaum exprimiert [354]. Cyclin D1 und Cyclin D3 werden auch durch die GSK3 direkt reguliert, so verursacht die aktive GSK3 β eine Degradation der beiden Zellzykluskomponenten [196, 305, 406]. Somit ist der Anstieg von Cyclin D3 in GOT1-Zellen nach AR-A014418-Behandlung wahrscheinlich direkte Folge der fehlenden Hemmung durch die GSK3 β [1].

Ein weiteres Zellzyklusprotein, Chk1, wurde in BON1-, QGP1- und H727-Zellen durch die AR-A014418-Behandlung aktiviert. Die Aktivierung von Chk1 verhindert das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus, gibt der Zelle Gelegenheit ihre DNA-Integrität wiederherzustellen und verhindert somit die unmittelbare Apoptose [407, 408]. Die Rolle von Chk1 als Tumorpromotor wird vermutet [409] und die

therapeutische Nutzung einer Chk1-Hemmung in der Antikrebstherapie wurde bereits vorgeschlagen [410]. Die fehlende Chk1-Aktivierung durch die GSK3-Hemmung in GOT1-Zellen kann somit zur höheren Sensibilität dieser gegenüber AR-A014418 beitragen.

Die Chk1-Aktivierung in BON1-, QGP1 und H727-Zellen ist hierbei vermutlich keine direkte Konsequenz der GSK3-Hemmung, sondern viel eher eine indirekte Antwort der gestressten und sterbenden Zelle auf die AR-A014418-Behandlung [1].

Interessanterweise konnte nur in H727- und GOT1-Zellen ein Anstieg von p21^{Cip1} unter AR-A014418-Gabe beobachtet werden, was wahrscheinlich direkte Konsequenz der GSK3-Hemmung ist [202]. Dies kann ein weiterer Grund für die höhere Sensibilität von GOT1-Zellen gegenüber AR-A014418 sein. Der genaue Mechanismus hinter der p21^{Cip1}-Erniedrigung in BON1- und QGP1-Zellen unter GSK3-Hemmung muss noch geklärt werden.

Die p21^{Cip} hemmt CDKs und kontrolliert so das Zellwachstum, eine p21^{Cip}-Erhöhung führt hierbei zu einem Stillstand im Zellzyklus [411].

Zellzyklus

Unsere Durchflusszytometrie (FACS)-Analysen zeigten eine starke Erhöhung in der SubG1-Phase in allen vier untersuchten Zelllinien, was den Tod der Zelle anzeigt. Mögliche Zelltodmechanismen nach einer AR-A014418-Behandlung werden im nächsten Abschnitt genauer diskutiert. Die GSK3-Hemmung zeigte insgesamt trotz Veränderungen in der Expression von Cyclin D1, Cyclin D3 und Chk1 keinen relevanten Effekt auf den Zellzyklus in den von uns untersuchten Zelllinien. Die Veränderungen in H727- und GOT1-Zellen in der S- und G2/M-Phase waren nur gering ausgeprägt und in hohen Konzentrationsbereichen von AR-A014418 zu beobachten, so dass deren Bedeutung vermutlich nur gering ist. In anderen Tumorzellentitäten wie Zervixkarzinom- [358] oder Neuroblastomzellen [331] konnte hingegen ein G2/M-Zyklusarrest nach GSK3-Hemmung beobachtet werden [1].

Zelltod

Yoshino et al. untersuchten mögliche Zelltodmechanismen durch die AR-A014418-Behandlung genauer und schlugen zwei Wege des Zelltodes vor: die Apoptose und die „mitotic catastrophe“ [358].

In H727- und GOT1-Zellen wurde eine Apoptoseinduktion durch die AR-A014418-Behandlung beobachtet, was sich in dem Anstieg der Caspase 3- und 7-Aktivität zeigte. [1]

Eine verstärkte Apoptose durch eine GSK3-Hemmung konnte ebenfalls in Neuroblastomzellen [125], nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen [412], Kolonkarzinomzellen [119] und Osteosarkomzellen [413] gezeigt werden.

In BON1-Zellen wirkte sich die GSK3-Hemmung hingegen statistisch signifikant antiapoptotisch nach 72 h aus, was sich in einem Abfall der Caspase 3- und 7-Aktivität zeigte. Auch in Kolonadenokarzinomzellen wurde ein antiapoptotischer Effekt der GSK3-Hemmung beobachtet, so verringerte eine AR-A014418-Behandlung den proapoptotischen Effekt von Proadifen [1][414].

Wir untersuchten zusätzlich LC3AII in BON1-Zellen und fanden eine Erhöhung dieses Markers, was auf Autophagie hinweist. Somit können in BON1-Zellen die Autophagie oder die Nekrose durch die „mitotic catastrophe“ mögliche Zelltodmechanismen sein [1].

QGP1-Zellen nahmen in unseren Untersuchungen eine Zwischenposition ein. Die GSK3-Hemmung wirkte pro- oder antiapoptotisch abhängig von der AR-A014418-Inkubationsdauer. So kam es nach 72 h zu einem statistisch signifikanten Abfall der Caspase 3- und 7-Aktivität, nach 144 h jedoch zu einem Anstieg und somit zur Apoptose. Es konnte gezeigt werden, dass nur die Hemmung der GSK3 β durch Phosphorylierung an Serin 9 proapoptotisch wirkt [103, 415, 416]. Bei der von uns mit dem Western Blot untersuchten Inkubationsdauer von 48 h zeigte sich nur eine α -Hemmung in QGP1-Zellen, möglicherweise kam es nach längerer Inkubationszeit von AR-A014418 auch zu einer GSK3 β -Hemmung mit darauffolgenden Apoptose.

Zusammenfassend gehen also H727- und GOT1-Zellen in Apoptose durch die GSK3-Hemmung, BON1-Zellen gehen wahrscheinlich in Nekrose durch eine „mitotic catastrophe“ oder aber in Autophagie. QGP1-Zellen gehen entweder in Apoptose oder in Nekrose, abhängig von der AR-A014418-Inkubationsdauer [1].

Apoptose

Die GSK3 wirkt je nach zellulärem Kontext pro- oder antiapoptotisch [100, 102], einen Überblick wie die GSK3 Einfluss auf die Apoptose einer Zelle nehmen kann, wurde in dem Unterpunkt „Apoptose“ in der Einleitung gegeben, die genauen Mechanismen sind hierbei noch nicht ausreichend untersucht.

Yoshino et al. vermuten, dass die Art des Zelltodes von dem p53-Mutationsstatus der Zelle abhängt [358].

In H727-Zellen kam es trotz Abfall von p53 zu einer Apoptose in Folge der GSK3-Hemmung. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es in H727-Zellen zu einer p53-unabhängigen Apoptose kam.

Auch Miyake beobachteten in NET-Zellen eine p53-unabhängige Apoptose durch eine mTOR-Hemmung [417].

In H727-Zellen konnte zudem ein Abfall des p53-Inhibitors und antiapoptotischen Proteins Bcl-2 beobachtet werden. Eine verstärkte Apoptose nach Bcl-2-Abfall durch eine GSK3-Hemmung wurde ebenfalls in Osteosarkom- [413] und Glioblastomzellen [351] beobachtet. Jiang und Milner konnten in Rektumkarzinomzellen nachweisen, dass das alleinige Fehlen von Bcl-2 ausreichte, um eine Apoptose in den Zellen auszulösen unabhängig von der p53-Expression [418]. In Pankreaskarzinom- [218], Nierenzellkarzinom- [383] und chronisch lymphatischen Leukämie-B-Zellen [333] konnte ebenfalls ein Abfall von Bcl-2 mit folgender Apoptose gezeigt werden, wobei hier der vermutete Mechanismus die verminderte Transkriptionsaktivität von NF- κ B durch die GSK3-Hemmung und folgender verminderter Expression von dessen Zielgen Bcl-2 war [1].

Somit ist ein möglicher Mechanismus der p53-unabhängigen Apoptoseinduktion in H727-Zellen der Abfall von Bcl-2, möglicherweise über die Hemmung von NF- κ B vermittelt [1].

In BON1-Zellen kam es zu einem Abfall von p53 nach AR-A014418-Behandlung, hier jedoch zusammen mit einer Erhöhung von Bcl-2, was in Einklang mit der Beobachtung der verminderten Apoptose in BON1-Zellen steht [1].

In QGP1-Zellen ebenso wie in GOT1-Zellen kam es weder zu einer Veränderung des p53-Niveaus noch zu einer Veränderung von Bcl-2, weshalb die genauen Mechanismen des Zelltodes nach AR-A014418-Behandlung für diese zwei Zelllinien unklar bleiben [1].

Einschränkung der Übertragbarkeit unserer Ergebnisse

Es ist an dieser Stelle wichtig zu erwähnen, dass die Regulierung zwischen der GSK3 und p53 am besten in gesunden Zellen mit Wildtyp-p53 verstanden sind. Insofern können die Interaktionen zwischen der GSK3 und p53 in Zellen mit mutierter p53 abweichen. In unseren Zellen liegt lediglich in GOT1-Zellen Wildtyp-p53 vor [355], in BON1- [419], QGP1- [419] und H727- [420] Zellen ist p53 hingegen meist mutiert [421]. Somit sind die Ergebnisse, die wir aus BON1-, QGP1- und H727-Zellen bezüglich dem Verhalten von p53 unter GSK3-Hemmung erhalten, nur

eingeschränkt auf tatsächliche NET übertragbar. Untersuchungen von NET-Tumorproben aus Patienten ergaben, dass weder in gut differenzierten bronchopulmonalen Karzinoiden [422-425] noch in pankreatischen NET [426] oder gastrointestinalen NET [398, 427] p53 mutiert ist. Somit sind die Ergebnisse, die wir aus BON1-, QGP1- und H727-Zellen bezüglich dem Verhalten von p53 unter GSK3-Hemmung erhalten, nur eingeschränkt auf tatsächliche NET übertragbar.

Nicht nur in Hinblick auf die p53 muss beachtet werden, dass die von uns untersuchten Zelllinien BON1, QGP1 und H727 Unterschiede in Mutationsrate und -muster [419] zu den gut differenzierten NET in Patienten zeigen [421]. Somit werden die Erkenntnisse, die aus Experimenten mit diesen Zelllinien stammen, nicht uneingeschränkt auf gut differenzierte NET übertragbar sein, können aber trotzdem eine erste wertvolle Idee geben und sind der erste unumgängliche Schritt vor weiterführenden *in vivo* Experimenten und klinischen Studien.

Epidermal Growth Factor-Rezeptor

In allen vier von uns untersuchten Zelllinien wurde durch die Behandlung mit AR-A014418 der EGFR gehemmt, wobei die GSK3-Hemmung am ehesten keinen direkten Effekt auf den EGFR hat. Eine GSK3-Hemmung kann über die Hemmung von NF- κ B zu einer EGFR-Hemmung führen [428], denn die GSK3 aktiviert NF- κ B [196, 218, 333] und NF- κ B kann wiederum zu einer Aktivierung von EGFR führen [428].

Eine EGFR-Überexpression führt in NET zu einer Aktivierung proliferativer und mitotischer Signalwegskaskaden [191, 429], eine EGFR-Hemmung durch Gefitinib in Patienten mit Mitteldarm-NET zeigte gleichwohl eine – wenn auch nur geringe – Antitumoraktivität [430]. Nichtsdestoweniger bleibt EGFR ein rationaler Angriffspunkt und die EGFR-Hemmung kann zu dem Antitumorpotenzial von AR-A014418 beitragen und ist sicherlich ein interessanter neuer Aspekt der Wirkweise dieser Substanz [1].

Insulin-like Growth Factor 1-Rezeptor

Eine weitere Rezeptor-Tyrosinkinase, die eine wichtige Rolle bei der Proliferation der Zelle spielt und Forschungsziel in der Krebstherapie ist, ist IGF1R [431].

IGF1R-Signaling führt ebenso wie EGFR-Signaling zu einer Aktivierung proliferativer Signalwege wie PI3K/Akt/mTORC1 [191] und reguliert über diesen Weg auch die GSK3 [95]. Epidemiologische Studien zeigten eine Assoziation

zwischen erhöhten IGF1-Serumspiegeln und dem Risiko ein Malignom in Brust, Prostata oder Kolon zu entwickeln [431-433].

In NET ist eine verstärkte/abnormale Expression von IGF1R beschrieben [429], wobei diese von der NET-Entität abhängig zu sein scheint [434].

Durch die Behandlung unserer Zelllinien mit AR-A014418 zeigte sich eine Hemmung von IGF1R, die besonders deutlich in BON1-Zellen ausgeprägt war. Dies kann auf die GSK3-Hemmung zurückzuführen sein, denn die GSK3 kann forkhead box O (FOXO)-vermittelt IGF1R aktivieren [435]. Die IGF1R-Hemmung durch eine Behandlung mit AR-A014418 kann somit Teil der antiproliferativen Wirkung der Substanz sein.

Es scheint zwar eine Diskrepanz zwischen vielversprechenden präklinischen Studien und enttäuschenden ersten klinischen Phase I- [436] und II-Studien mit IGF1R-Inhibitoren zu geben [437], die IGF1R-Hemmung bleibt aber dennoch weiterhin interessantes Forschungsziel in der NET-Therapie. Möglicherweise ließe sich hier die Wirksamkeit durch die Kombination verschiedener molekular gezielter Medikamente verbessern, wie bereits in NET- und Phäochromozytomzellen gezeigt wurde [336, 338].

6) Zusammenfassung

Der spezifische GSK3 α/β -Inhibitor AR-A014418 hemmte zeit- und dosisabhängig die Zellproliferation in den humanen neuroendokrinen Tumorzelllinien BON1, QGP1, H727 und GOT1 durch Hemmung des mTORC1/p70S6K-Signalweges sowie Hemmung des EGFR und IGF1R. Die wirksamen Dosen (5 μ M und höher) in unseren Zelllinienmodellen sind in Hinblick auf andere therapeutisch bereits angewandte GSK3-Inhibitoren möglicherweise klinisch relevant. Eine kompensatorische Akt- und ERK-Aktivierung durch AR-A014418 konnte durch die Kombinationsgabe mit Lovastatin verhindert werden und zeigte in BON1- und QGP1-Zellen einen synergistischen Effekt. Zudem zeigte AR-A014418 signifikante chemosensibilisierende Eigenschaften in Kombination mit 5-FU in QGP1-Zellen. Es konnte zudem ein migrationshemmender Effekt durch eine GSK3-Hemmung in den drei untersuchten Zelllinien BON1, QGP1 und H727 festgestellt werden [1].

Die GSK3-Hemmung hatte in NET-Zellen keinen relevanten Einfluss auf den Zellzyklus. In H727- und GOT1-Zellen zeigte die Behandlung mit AR-A014418 proapoptotische, in BON1-Zellen hingegen antiapoptotische Effekte.

Weiterführende *in vivo* Experimente und klinische Phase I/II-Studien mit spezifischen GSK3 α/β -Inhibitoren in der Therapie von NET scheinen somit berechtigt und wünschenswert [1].

IV) Literaturverzeichnis

1. Aristizabal Prada, E.T., et al., *GSK3alpha/beta: A Novel Therapeutic Target for Neuroendocrine Tumors*. Neuroendocrinology, 2018. **106**(4): p. 335-351.
2. Klöppel, G. and P.U. Heitz, *Die disseminierten (diffusen) endokrinen Zellen*, in *Spezielle pathologische Anatomie*, W. Doerr and G. Seifert, Editors. 1981, Springer: Berlin. p. 1079-1135.
3. Wilson, B.S. and R.V. Lloyd, *Detection of chromogranin in neuroendocrine cells with a monoclonal antibody*. Am J Pathol, 1984. **115**(3): p. 458-68.
4. Wiedenmann, B., et al., *Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(10): p. 3500-4.
5. Oberndorfer, S., *Karzinomide Tumoren des Dünndarms*. Frankf Z Pathol, 1907. **1**: p. 426-429.
6. Modlin, I.M., M.D. Shapiro, and M. Kidd, *Siegfried Oberndorfer: origins and perspectives of carcinoid tumors*. Hum Pathol, 2004. **35**(12): p. 1440-51.
7. Soga, J., Y. Yakuwa, and M. Osaka, *Evaluation of 342 cases of mediastinal/thymic carcinoids collected from literature: a comparative study between typical carcinoids and atypical varieties*. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 1999. **5**(5): p. 285-92.
8. Soga, J., M. Osaka, and Y. Yakuwa, *Gut-endocrinomas (carcinoids and related endocrine variants) of the breast: an analysis of 310 reported cases*. Int Surg, 2001. **86**(1): p. 26-32.
9. Murali, R., et al., *Carcinoid tumors of the urinary tract and prostate*. Arch Pathol Lab Med, 2006. **130**(11): p. 1693-706.
10. Modlin, I.M., K.D. Lye, and M. Kidd, *A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors*. Cancer, 2003. **97**(4): p. 934-59.
11. Lawrence, B., et al., *The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2011. **40**(1): p. 1-18, vii.
12. Yao, J.C., et al., *One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States*. J Clin Oncol, 2008. **26**(18): p. 3063-72.
13. Modlin, I.M., et al., *Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours*. Lancet Oncol, 2008. **9**(1): p. 61-72.
14. Fraenkel, M., et al., *Incidence of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: a systematic review of the literature*. Endocr Relat Cancer, 2014. **21**(3): p. R153-63.
15. Hauso, O., et al., *Neuroendocrine tumor epidemiology: contrasting Norway and North America*. Cancer, 2008. **113**(10): p. 2655-64.
16. Oberg, K., *Genetics and molecular pathology of neuroendocrine gastrointestinal and pancreatic tumors (gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors)*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2009. **16**(1): p. 72-8.

17. Bystrom, C., et al., *Localization of the MEN1 gene to a small region within chromosome 11q13 by deletion mapping in tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(5): p. 1968-72.
18. Debelenko, L.V., et al., *Allelic deletions on chromosome 11q13 in multiple endocrine neoplasia type 1-associated and sporadic gastrinomas and pancreatic endocrine tumors*. Cancer Res, 1997. **57**(11): p. 2238-43.
19. Komminoth, P., et al., *RET proto-oncogene point mutations in sporadic neuroendocrine tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(6): p. 2041-6.
20. Anlauf, M., et al., *Hereditary neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system*. Virchows Arch, 2007. **451 Suppl 1**: p. S29-38.
21. Lodish, M.B. and C.A. Stratakis, *Endocrine tumours in neurofibromatosis type 1, tuberous sclerosis and related syndromes*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2010. **24**(3): p. 439-49.
22. Thakker, R.V., *Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) and type 4 (MEN4)*. Mol Cell Endocrinol, 2014. **386**(1-2): p. 2-15.
23. Scoazec, J.Y. and A. Couvelard, *[Classification of pancreatic neuroendocrine tumours: Changes made in the 2017 WHO classification of tumours of endocrine organs and perspectives for the future]*. Ann Pathol, 2017. **37**(6): p. 444-456.
24. Klimstra, D.S., et al., *WHO Classification of Tumours: Digestive System Tumours*. 5 ed, ed. W.C.o.T.E.B. (Ed). Vol. 1. 2019, Lyon: International Agency for Research on Cancer.
25. Lloyd, R.V., et al., *WHO Classification of Tumors of Endocrine Organs*. 4 ed. Vol. 10. 2017, Lyon: IARC Press.
26. Brierley, J.D., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *The TNM Classification of Malignant Tumours*. 8th ed. 2016, Hoboken (New Jersey), USA: Wiley-Blackwell.
27. Brierley, J.D., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM Classification of Malignant Tumours*. 2017, Hoboken (New Jersey), USA: Wiley-Blackwell.
28. Herrmann, F.M., P.; Lohmann, T.; Wallaschofski, H., *Endokrinologie für die Praxis*. 2015, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
29. Arnold, R., et al., *Neuroendokrine Tumoren - Klinik, biochemische Diagnostik und natürlicher Verlauf*. Der Onkologe, 2004. **10**(6): p. 560-569.
30. Petersenn, S., *Neuroendokrine Tumoren Seltene medizinische Phänomene*. Essener Unikate, 2005. **25**: p. 62-75.
31. Herold, G., *Innere Medizin*. 2018, Köln: Herold, Gerd.
32. Rinke, S.A., R., *Aktuelle Therapie neuroendokriner Tumoren*. Arzneimitteltherapie, 2014. **32**(1/2): p. 2-13.
33. Pavel, M., et al., *ENETS Consensus Guidelines for the management of patients with liver and other distant metastases from neuroendocrine neoplasms of foregut, midgut, hindgut, and unknown primary*. Neuroendocrinology, 2012. **95**(2): p. 157-76.
34. Göke, B., et al., *Manual Endokrine Tumoren - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. 4 ed, ed. B. Göke, et al. 2017, München: W. Zuckerschwerdt Verlag. 300.
35. Mazzaglia, P.J., et al., *Laparoscopic radiofrequency ablation of neuroendocrine liver metastases: a 10-year experience evaluating predictors of survival*. Surgery, 2007. **142**(1): p. 10-9.

36. Gupta, S., et al., *Hepatic arterial embolization and chemoembolization for the treatment of patients with metastatic neuroendocrine tumors: variables affecting response rates and survival*. *Cancer*, 2005. **104**(8): p. 1590-602.
37. Vogl, T.J., et al., *Liver metastases of neuroendocrine tumors: treatment with hepatic transarterial chemotherapy using two therapeutic protocols*. *AJR Am J Roentgenol*, 2009. **193**(4): p. 941-7.
38. Auernhammer, C.J., et al., *Advanced neuroendocrine tumours of the small intestine and pancreas: clinical developments, controversies, and future strategies*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2018. **6**(5): p. 404-415.
39. Garcia-Carbonero, R., et al., *ENETS Consensus Guidelines for High-Grade Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors and Neuroendocrine Carcinomas*. *Neuroendocrinology*, 2016. **103**(2): p. 186-94.
40. de Herder, W.W., et al., *Somatostatin receptors in gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumours*. *Endocr Relat Cancer*, 2003. **10**(4): p. 451-8.
41. Jonas, S., et al., *Somatostatin receptor subtypes in neuroendocrine tumor cell lines and tumor tissues*. *Langenbecks Arch Chir*, 1995. **380**(2): p. 90-5.
42. Rinke, A., et al., *Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(28): p. 4656-63.
43. Caplin, M.E., M. Pavel, and P. Ruszniewski, *Lanreotide in metastatic enteropancreatic neuroendocrine tumors*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(16): p. 1556-7.
44. Albertelli, M., et al., *Anti-tumoral effects of somatostatin analogs: a lesson from the CLARINET study*. *J Endocrinol Invest*, 2017. **40**(11): p. 1265-1269.
45. Pavel, M., et al., *ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Neoplasms: Systemic Therapy - Biotherapy and Novel Targeted Agents*. *Neuroendocrinology*, 2017. **105**(3): p. 266-280.
46. Auernhammer, C.J. and B. Goke, *Therapeutic strategies for advanced neuroendocrine carcinomas of jejunum/ileum and pancreatic origin*. *Gut*, 2011. **60**(7): p. 1009-21.
47. Modlin, I.M., et al., *Review article: somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine (carcinoid) tumours*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2010. **31**(2): p. 169-88.
48. Krulich, L., A.P. Dhariwal, and S.M. McCann, *Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro*. *Endocrinology*, 1968. **83**(4): p. 783-90.
49. Reichlin, S., *Somatostatin*. *N Engl J Med*, 1983. **309**(24): p. 1495-501.
50. Brazeau, P., et al., *Hypothalamic Polypeptide That Inhibits the Secretion of Immunoreactive Pituitary Growth Hormone*. *Science*, 1973. **179**(4068): p. 77-79.
51. Wang, Y., et al., *Somatostatin receptor expression indicates improved prognosis in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasm, and octreotide long-acting release is effective and safe in Chinese patients with advanced gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors*. *Oncol Lett*, 2017. **13**(3): p. 1165-1174.
52. Pavel, M., et al., *Telotristat etiprate for carcinoid syndrome: a single-arm, multicenter trial*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015. **100**(4): p. 1511-9.

53. Garcia-Carbonero, R., et al., *ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Neoplasms. Systemic Therapy 2: Chemotherapy*. Neuroendocrinology, 2017. **105**(3): p. 281-294.
54. Pavel, M., et al., *ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Distant Metastatic Disease of Intestinal, Pancreatic, Bronchial Neuroendocrine Neoplasms (NEN) and NEN of Unknown Primary Site*. Neuroendocrinology, 2016. **103**(2): p. 172-85.
55. Cives, M., et al., *Analysis of potential response predictors to capecitabine/temozolomide in metastatic pancreatic neuroendocrine tumors*. Endocr Relat Cancer, 2016. **23**(9): p. 759-67.
56. Yao, J.C., et al., *Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study*. Lancet, 2016. **387**(10022): p. 968-977.
57. Bajetta, E., et al., *Everolimus in combination with octreotide long-acting repeatable in a first-line setting for patients with neuroendocrine tumors: an ITMO group study*. Cancer, 2014. **120**(16): p. 2457-63.
58. Yao, J.C., et al., *Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors*. N Engl J Med, 2011. **364**(6): p. 514-23.
59. Raymond, E., et al., *Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors*. N Engl J Med, 2011. **364**(6): p. 501-13.
60. Sun, L., et al., *Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase*. J Med Chem, 2003. **46**(7): p. 1116-9.
61. Potente, M., H. Gerhardt, and P. Carmeliet, *Basic and therapeutic aspects of angiogenesis*. Cell, 2011. **146**(6): p. 873-87.
62. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
63. Houghton, P.J., *Everolimus*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(5): p. 1368-72.
64. Hicks, R.J., et al., *ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Neoplasia: Peptide Receptor Radionuclide Therapy with Radiolabeled Somatostatin Analogues*. Neuroendocrinology, 2017. **105**(3): p. 295-309.
65. Strosberg, J., et al., *Phase 3 Trial of (177)Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors*. N Engl J Med, 2017. **376**(2): p. 125-135.
66. Esser, J.P., et al., *Comparison of [(177)Lu-DOTA(0),Tyr(3)]octreotate and [(177)Lu-DOTA(0),Tyr(3)]octreotide: which peptide is preferable for PRRT?* Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2006. **33**(11): p. 1346-51.
67. Valkema, R., et al., *Survival and response after peptide receptor radionuclide therapy with [90Y-DOTA0,Tyr3]octreotide in patients with advanced gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors*. Semin Nucl Med, 2006. **36**(2): p. 147-56.
68. Dasari, A., et al., *Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States*. JAMA Oncol, 2017. **3**(10): p. 1335-1342.

69. Pape, U.F., et al., *Prognostic factors of long-term outcome in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours*. *Endocr Relat Cancer*, 2008. **15**(4): p. 1083-97.
70. Embi, N., D.B. Rylatt, and P. Cohen, *Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase*. *Eur J Biochem*, 1980. **107**(2): p. 519-27.
71. Woodgett, J.R., *Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A*. *Embo j*, 1990. **9**(8): p. 2431-8.
72. Woodgett, J.R. and P. Cohen, *Multisite phosphorylation of glycogen synthase. Molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-II (glycogen synthase kinase-5)*. *Biochim Biophys Acta*, 1984. **788**(3): p. 339-47.
73. Shaw, P.C., et al., *Isolation and chromosomal mapping of human glycogen synthase kinase-3 alpha and -3 beta encoding genes*. *Genome*, 1998. **41**(5): p. 720-7.
74. Hughes, K., et al., *Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation*. *Embo j*, 1993. **12**(2): p. 803-8.
75. Cross, D.A., et al., *The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf*. *Biochem J*, 1994. **303** (Pt 1): p. 21-6.
76. Joep, R.S. and G.V. Johnson, *The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3*. *Trends Biochem Sci*, 2004. **29**(2): p. 95-102.
77. Sutherland, C. and P. Cohen, *The alpha-isoform of glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle is inactivated by p70 S6 kinase or MAP kinase-activated protein kinase-1 in vitro*. *FEBS Lett*, 1994. **338**(1): p. 37-42.
78. Dajani, R., et al., *Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition*. *Cell*, 2001. **105**(6): p. 721-32.
79. Sutherland, C., I.A. Leighton, and P. Cohen, *Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling*. *Biochem J*, 1993. **296** (Pt 1): p. 15-9.
80. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. *Nature*, 1995. **378**(6559): p. 785-9.
81. Cook, D., et al., *Wingless inactivates glycogen synthase kinase-3 via an intracellular signalling pathway which involves a protein kinase C*. *The EMBO Journal*, 1996. **15**(17): p. 4526-4536.
82. Murai, H., M. Okazaki, and A. Kikuchi, *Tyrosine dephosphorylation of glycogen synthase kinase-3 is involved in its extracellular signal-dependent inactivation*. *FEBS Lett*, 1996. **392**(2): p. 153-60.
83. Fang, X., et al., *Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(22): p. 11960-5.
84. Li, M., et al., *Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(24): p. 9356-63.
85. Stambolic, V. and J.R. Woodgett, *Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation*. *Biochem J*, 1994. **303** (Pt 3): p. 701-4.

86. Shaw, M. and P. Cohen, *Role of protein kinase B and the MAP kinase cascade in mediating the EGF-dependent inhibition of glycogen synthase kinase 3 in Swiss 3T3 cells*. FEBS Lett, 1999. **461**(1-2): p. 120-4.
87. Saito, Y., J.R. Vandenheede, and P. Cohen, *The mechanism by which epidermal growth factor inhibits glycogen synthase kinase 3 in A431 cells*. Biochemical Journal, 1994. **303**(1): p. 27-31.
88. Cohen, P., H.G. Nimmo, and C.G. Proud, *How does insulin stimulate glycogen synthesis?* Biochem Soc Symp, 1978(43): p. 69-95.
89. Welsh, G.I., et al., *Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin*. FEBS Lett, 1998. **421**(2): p. 125-30.
90. Welsh, G.I. and C.G. Proud, *Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B*. Biochem J, 1993. **294** (Pt 3): p. 625-9.
91. Shaw, M., P. Cohen, and D.R. Alessi, *The activation of protein kinase B by H₂O₂ or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mtogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2*. Biochemical Journal, 1998. **336**: p. 241-246.
92. Bijur, G.N. and R.S. Jope, *Opposing actions of phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase-3 β in the regulation of HSF-1 activity*. J Neurochem, 2000. **75**(6): p. 2401-8.
93. Kim, L., J. Liu, and A.R. Kimmel, *The novel tyrosine kinase ZAK1 activates GSK3 to direct cell fate specification*. Cell, 1999. **99**(4): p. 399-408.
94. Wang, Q.M., et al., *Glycogen synthase kinase-3 β is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation*. J Biol Chem, 1994. **269**(20): p. 14566-74.
95. Frame, S. and P. Cohen, *GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery*. Biochem J, 2001. **359**(Pt 1): p. 1-16.
96. Fiol, C.J., et al., *Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3*. J Biol Chem, 1987. **262**(29): p. 14042-8.
97. Frame, S., P. Cohen, and R.M. Biondi, *A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation*. Mol Cell, 2001. **7**(6): p. 1321-7.
98. Fiol, C.J., et al., *Phosphoserine as a recognition determinant for glycogen synthase kinase-3: phosphorylation of a synthetic peptide based on the G-component of protein phosphatase-1*. Arch Biochem Biophys, 1988. **267**(2): p. 797-802.
99. ter Haar, E., et al., *Structure of GSK3 β reveals a primed phosphorylation mechanism*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(7): p. 593-6.
100. Jacobs, K.M., et al., *GSK-3 β : A Bifunctional Role in Cell Death Pathways*. Int J Cell Biol, 2012. **2012**: p. 930710.
101. Sun, T., M. Rodriguez, and L. Kim, *Glycogen synthase kinase 3 in the world of cell migration*. Dev Growth Differ, 2009. **51**(9): p. 735-42.
102. Beurel, E. and R.S. Jope, *The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways*. Prog Neurobiol, 2006. **79**(4): p. 173-89.

103. Tan, J., et al., *Pharmacologic modulation of glycogen synthase kinase-3beta promotes p53-dependent apoptosis through a direct Bax-mediated mitochondrial pathway in colorectal cancer cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(19): p. 9012-20.
104. Hoeflich, K.P., et al., *Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation*. *Nature*, 2000. **406**(6791): p. 86-90.
105. Eldar-Finkelman, H., et al., *Increased glycogen synthase kinase-3 activity in diabetes- and obesity-prone C57BL/6J mice*. *Diabetes*, 1999. **48**(8): p. 1662-6.
106. Martinez, A., et al., *Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors as new promising drugs for diabetes, neurodegeneration, cancer, and inflammation*. *Med Res Rev*, 2002. **22**(4): p. 373-84.
107. Dimitrakopoulos, S. and G. Konstantakopoulos, *Pharmacological agents under research for the maintenance treatment in bipolar disorder*. *Psychiatriki*, 2015. **26**(3): p. 169-80.
108. Phiel, C.J., et al., *GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides*. *Nature*, 2003. **423**(6938): p. 435-9.
109. Lei, P., et al., *GSK-3 in Neurodegenerative Diseases*. *Int J Alzheimers Dis*, 2011. **2011**: p. 189246.
110. Patel, S. and J. Woodgett, *Glycogen synthase kinase-3 and cancer: good cop, bad cop?* *Cancer Cell*, 2008. **14**(5): p. 351-3.
111. Neumann, T., et al., *Evaluation of Improved Glycogen Synthase Kinase-3alpha Inhibitors in Models of Acute Myeloid Leukemia*. *J Med Chem*, 2015. **58**(22): p. 8907-19.
112. Li, L., et al., *Lithium Chloride Promotes Apoptosis in Human Leukemia NB4 Cells by Inhibiting Glycogen Synthase Kinase-3 Beta*. *Int J Med Sci*, 2015. **12**(10): p. 805-10.
113. Zhou, F., et al., *GSK3beta inactivation induces apoptosis of leukemia cells by repressing the function of c-Myb*. *Mol Biol Cell*, 2011. **22**(18): p. 3533-40.
114. Song, E.Y., et al., *Glycogen synthase kinase--3beta inhibitors suppress leukemia cell growth*. *Exp Hematol*, 2010. **38**(10): p. 908-921.e1.
115. Kitano, A., et al., *Aberrant glycogen synthase kinase 3beta is involved in pancreatic cancer cell invasion and resistance to therapy*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e55289.
116. Ougolkov, A.V., et al., *Aberrant nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3beta in human pancreatic cancer: association with kinase activity and tumor dedifferentiation*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(17): p. 5074-81.
117. Kunnimalaiyaan, S., T.C. Gamblin, and M. Kunnimalaiyaan, *Glycogen synthase kinase-3 inhibitor AR-A014418 suppresses pancreatic cancer cell growth via inhibition of GSK-3-mediated Notch1 expression*. *HPB (Oxford)*, 2015. **17**(9): p. 770-6.
118. Marchand, B., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 activity triggers an apoptotic response in pancreatic cancer cells through JNK-dependent mechanisms*. *Carcinogenesis*, 2012. **33**(3): p. 529-37.
119. Ghosh, J.C. and D.C. Altieri, *Activation of p53-Dependent Apoptosis by Acute Ablation of Glycogen Synthase Kinase-3β in Colorectal Cancer Cells*. *Clinical Cancer Research*, 2005. **11**(12).
120. Shakoory, A., et al., *Inhibition of GSK-3 beta activity attenuates proliferation of human colon cancer cells in rodents*. *Cancer Sci*, 2007. **98**(9): p. 1388-93.

121. Li, B., J.B. Thrasher, and P. Terranova, *Glycogen synthase kinase-3: A potential preventive target for prostate cancer management*. Urol Oncol, 2015. **33**(11): p. 456-63.
122. Greenblatt, D.Y., et al., *Lithium inhibits carcinoid cell growth in vitro*. Am J Transl Res, 2010. **2**(3): p. 248-53.
123. Adler, J.T., et al., *Combination therapy with histone deacetylase inhibitors and lithium chloride: a novel treatment for carcinoid tumors*. Ann Surg Oncol, 2009. **16**(2): p. 481-6.
124. Kunnimalaiyaan, M., et al., *Inactivation of glycogen synthase kinase-3beta, a downstream target of the raf-1 pathway, is associated with growth suppression in medullary thyroid cancer cells*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(3): p. 1151-8.
125. Carter, Y.M., et al., *Specific glycogen synthase kinase-3 inhibition reduces neuroendocrine markers and suppresses neuroblastoma cell growth*. Cancer Biol Ther, 2014. **15**(5): p. 510-5.
126. Dent, P., *New methods to control neuroblastoma growth*. Cancer Biol Ther, 2014. **15**(5): p. 481-2.
127. Cantley, L.C., *The phosphoinositide 3-kinase pathway*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1655-7.
128. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 153-83.
129. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(7): p. 489-501.
130. Luo, J., B.D. Manning, and L.C. Cantley, *Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise*. Cancer Cell, 2003. **4**(4): p. 257-62.
131. Bellacosa, A., et al., *Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas*. Int J Cancer, 1995. **64**(4): p. 280-5.
132. Sun, M., et al., *Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and PI3K*. Cancer Res, 2001. **61**(16): p. 5985-91.
133. Sun, M., et al., *AKT1/PKBalpha Kinase is frequently elevated in human cancer and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells*. The American Journal of Pathology, 2001. **159**(2): p. 431-437.
134. Wang, S.I., et al., *Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme*. Cancer Res, 1997. **57**(19): p. 4183-6.
135. Salvesen, H.B., et al., *PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma*. Int J Cancer, 2001. **91**(1): p. 22-6.
136. Yokoyama, Y., et al., *Expression of PTEN and PTEN pseudogene in endometrial carcinoma*. Int J Mol Med, 2000. **6**(1): p. 47-50.
137. Zhou, X.P., et al., *Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation*. Am J Pathol, 2000. **157**(4): p. 1123-8.
138. Celebi, J.T., et al., *Identification of PTEN mutations in metastatic melanoma specimens*. J Med Genet, 2000. **37**(9): p. 653-7.
139. Pitt, S.C., H. Chen, and M. Kunnimalaiyaan, *Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling suppresses tumor cell proliferation and*

- neuroendocrine marker expression in GI carcinoid tumors. Ann Surg Oncol*, 2009. **16**(10): p. 2936-42.
140. Robbins, H.L. and A. Hague, *The PI3K/Akt Pathway in Tumors of Endocrine Tissues*. Front Endocrinol (Lausanne), 2015. **6**: p. 188.
 141. Halaschek-Wiener, J., et al., *Ras inhibition leads to transcriptional activation of p53 and down-regulation of Mdm2: two mechanisms that cooperatively increase p53 function in colon cancer cells*. Cell Signal, 2004. **16**(11): p. 1319-27.
 142. Oka, H., et al., *Constitutive activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases in human renal cell carcinoma*. Cancer Res, 1995. **55**(18): p. 4182-7.
 143. Downward, J., *Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(1): p. 11-22.
 144. Liu, P., et al., *Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(8): p. 627-44.
 145. Dudek, H., et al., *Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt*. Science, 1997. **275**(5300): p. 661-5.
 146. Bjornsti, M.A. and P.J. Houghton, *The TOR pathway: a target for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(5): p. 335-48.
 147. O'Reilly, K.E., et al., *mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt*. Cancer Res, 2006. **66**(3): p. 1500-8.
 148. Bellacosa, A., et al., *Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain*. Oncogene, 1998. **17**(3): p. 313-25.
 149. Rafalski, V.A. and A. Brunet, *Energy metabolism in adult neural stem cell fate*. Prog Neurobiol, 2011. **93**(2): p. 182-203.
 150. Stokoe, D., et al., *Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B*. Science, 1997. **277**(5325): p. 567-70.
 151. Alessi, D.R., et al., *Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha*. Curr Biol, 1997. **7**(4): p. 261-9.
 152. Stephens, L., et al., *Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B*. Science, 1998. **279**(5351): p. 710-4.
 153. Zhang, H.H., et al., *S6K1 regulates GSK3 under conditions of mTOR-dependent feedback inhibition of Akt*. Mol Cell, 2006. **24**(2): p. 185-97.
 154. Thomas, G. and M.N. Hall, *TOR signalling and control of cell growth*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(6): p. 782-7.
 155. Ma, X.M. and J. Blenis, *Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(5): p. 307-18.
 156. Schmelzle, T. and M.N. Hall, *TOR, a central controller of cell growth*. Cell, 2000. **103**(2): p. 253-62.
 157. Scott, P.H., et al., *Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7772-7.
 158. Nave, B.T., et al., *Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation*. Biochem J, 1999. **344 Pt 2**: p. 427-31.

159. Hay, N. and N. Sonenberg, *Upstream and downstream of mTOR*. Genes Dev, 2004. **18**(16): p. 1926-45.
160. Cardenas, M.E., et al., *The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients*. Genes Dev, 1999. **13**(24): p. 3271-3279.
161. Inoki, K., et al., *TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth*. Cell, 2006. **126**(5): p. 955-68.
162. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *Rheb fills a GAP between TSC and TOR*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(11): p. 573-6.
163. Fingar, D.C., et al., *Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E*. Genes Dev, 2002. **16**(12): p. 1472-87.
164. Hara, K., et al., *Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR*. J Biol Chem, 1997. **272**(42): p. 26457-63.
165. Qin, X., B. Jiang, and Y. Zhang, *4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein*. Cell Cycle, 2016. **15**(6): p. 781-6.
166. Pause, A., et al., *Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function*. Nature, 1994. **371**(6500): p. 762-7.
167. Wang, L., C.J. Rhodes, and J.C. Lawrence, Jr., *Activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) by insulin is associated with stimulation of 4EBP1 binding to dimeric mTOR complex 1*. J Biol Chem, 2006. **281**(34): p. 24293-303.
168. Lawrence, J.C., Jr. and R.T. Abraham, *PHAS/4E-BPs as regulators of mRNA translation and cell proliferation*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(9): p. 345-9.
169. Jastrzebski, K., et al., *Coordinate regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function*. Growth Factors, 2007. **25**(4): p. 209-26.
170. Shin, S., et al., *Glycogen synthase kinase (GSK)-3 promotes p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) activity and cell proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(47): p. E1204-13.
171. Stambolic, V., et al., *Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN*. Cell, 1998. **95**(1): p. 29-39.
172. Maehama, T. and J.E. Dixon, *The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13375-8.
173. Li, J., et al., *PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer*. Science, 1997. **275**(5308): p. 1943-7.
174. Maehama, T. and J.E. Dixon, *PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase*. Trends Cell Biol, 1999. **9**(4): p. 125-8.
175. Um, S.H., et al., *Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity*. Nature, 2004. **431**(7005): p. 200-5.
176. Shi, Y., et al., *Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade*. Mol Cancer Ther, 2005. **4**(10): p. 1533-40.

177. Maccario, H., et al., *PTEN is destabilized by phosphorylation on Thr366*. Biochem J, 2007. **405**(3): p. 439-44.
178. Gadella, T.W., Jr. and T.M. Jovin, *Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation*. J Cell Biol, 1995. **129**(6): p. 1543-58.
179. Ogiso, H., et al., *Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains*. Cell, 2002. **110**(6): p. 775-87.
180. Leppanen, V.M., et al., *Structural determinants of growth factor binding and specificity by VEGF receptor 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(6): p. 2425-30.
181. Wiesmann, C., et al., *Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor*. Cell, 1997. **91**(5): p. 695-704.
182. McKay, M.M. and D.K. Morrison, *Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3113-21.
183. McCormick, F., *Signal transduction. How receptors turn Ras on*. Nature, 1993. **363**(6424): p. 15-6.
184. Morrison, D.K. and R.E. Cutler, *The complexity of Raf-1 regulation*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 174-9.
185. Kyriakis, J.M., et al., *Raf-1 activates MAP kinase-kinase*. Nature, 1992. **358**(6385): p. 417-21.
186. Schaeffer, H.J. and M.J. Weber, *Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(4): p. 2435-44.
187. Yoon, S. and R. Seger, *The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions*. Growth Factors, 2006. **24**(1): p. 21-44.
188. Mendoza, M.C., E.E. Er, and J. Blenis, *The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation*. Trends Biochem Sci, 2011. **36**(6): p. 320-8.
189. Kim, L. and A.R. Kimmel, *GSK3, a master switch regulating cell-fate specification and tumorigenesis*. Curr Opin Genet Dev, 2000. **10**(5): p. 508-14.
190. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.
191. Briest, F. and P. Grabowski, *PI3K-AKT-mTOR-signaling and beyond: the complex network in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms*. Theranostics, 2014. **4**(4): p. 336-65.
192. Gollob, J.A., et al., *Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway*. Semin Oncol, 2006. **33**(4): p. 392-406.
193. Nayak, G. and G.M. Cooper, *p53 is a major component of the transcriptional and apoptotic program regulated by PI 3-kinase/Akt/GSK3 signaling*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e400.
194. McCubrey, J.A., et al., *GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer*. Oncotarget, 2014. **5**(10): p. 2881-911.
195. Doble, B.W., *GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase*. Journal of Cell Science, 2003. **116**(7): p. 1175-1186.

196. Maurer, U., et al., *GSK-3 - at the crossroads of cell death and survival*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 7): p. 1369-78.
197. Sutherland, C., *What Are the bona fide GSK3 Substrates?* Int J Alzheimers Dis, 2011. **2011**: p. 505607.
198. Alt, J.R., et al., *Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation*. Genes Dev, 2000. **14**(24): p. 3102-14.
199. Diehl, J.A., et al., *Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization*. Genes & Development, 1998. **12**: p. 3499-3511.
200. Planas-Silva, M.D. and R.A. Weinberg, *The restriction point and control of cell proliferation*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(6): p. 768-72.
201. Hartwell, L.H. and M.B. Kastan, *Cell Cycle Control and Cancer*. Science, 1994. **266**.
202. Rossig, L., et al., *Glycogen synthase kinase-3 couples AKT-dependent signaling to the regulation of p21Cip1 degradation*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 9684-9.
203. Harper, J.W., et al., *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*. Cell, 1993. **75**(4): p. 805-16.
204. Xiong, Y., et al., *p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 701-4.
205. el-Deiry, W.S., et al., *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression*. Cell, 1993. **75**(4): p. 817-25.
206. Wang, Z., et al., *Glycogen synthase kinase 3 in MLL leukaemia maintenance and targeted therapy*. Nature, 2008. **455**(7217): p. 1205-9.
207. Xu, X., et al., *Mechanism of Cdk2/Cyclin E inhibition by p27 and p27 phosphorylation*. Biochemistry, 1999. **38**(27): p. 8713-22.
208. Ray, A., et al., *p27Kip1 inhibits cyclin D-cyclin-dependent kinase 4 by two independent modes*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(4): p. 986-99.
209. Linseman, D.A., et al., *Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis*. J Neurosci, 2004. **24**(44): p. 9993-10002.
210. Chao, D.T. and S.J. Korsmeyer, *BCL-2 family: regulators of cell death*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 395-419.
211. Kulikov, R., K.A. Boehme, and C. Blattner, *Glycogen synthase kinase 3-dependent phosphorylation of Mdm2 regulates p53 abundance*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(16): p. 7170-80.
212. Momand, J., H.H. Wu, and G. Dasgupta, *MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein*. Gene, 2000. **242**(1-2): p. 15-29.
213. Michael, D. and M. Oren, *The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system*. Semin Cancer Biol, 2003. **13**(1): p. 49-58.
214. Shi, D. and W. Gu, *Dual Roles of MDM2 in the Regulation of p53: Ubiquitination Dependent and Ubiquitination Independent Mechanisms of MDM2 Repression of p53 Activity*. Genes Cancer, 2012. **3**(3-4): p. 240-8.
215. Gregory, M.A., Y. Qi, and S.R. Hann, *Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization*. J Biol Chem, 2003. **278**(51): p. 51606-12.
216. Walz, S., et al., *Activation and repression by oncogenic MYC shape tumour-specific gene expression profiles*. Nature, 2014. **511**(7510): p. 483-7.

217. Sabo, A., et al., *Selective transcriptional regulation by Myc in cellular growth control and lymphomagenesis*. Nature, 2014. **511**(7510): p. 488-492.
218. Ougolkov, A.V., et al., *Glycogen synthase kinase-3 β participates in nuclear factor kappaB-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells*. Cancer Res, 2005. **65**(6): p. 2076-81.
219. Schwabe, R.F. and D.A. Brenner, *Role of glycogen synthase kinase-3 in TNF- α -induced NF-kappaB activation and apoptosis in hepatocytes*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(1): p. G204-11.
220. Guttridge, D.C., et al., *NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(8): p. 5785-99.
221. Catz, S.D. and J.L. Johnson, *Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer*. Oncogene, 2001. **20**(50): p. 7342-51.
222. Heckman, C.A., J.W. Meheew, and L.M. Boxer, *NF-kappaB activates Bcl-2 expression in t(14;18) lymphoma cells*. Oncogene, 2002. **21**(24): p. 3898-908.
223. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The Hallmarks of Cancer*. Cell, 2000. **100**: p. 57-70.
224. Naugler, W.E. and M. Karin, *NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(1): p. 19-26.
225. Basseres, D.S. and A.S. Baldwin, *Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6817-30.
226. Karin, M., *Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 431-6.
227. Al-Khoury, A.M., et al., *Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3 β* . J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35195-202.
228. Polakis, P., *Casein kinase 1: a Wnt'er of disconnect*. Curr Biol, 2002. **12**(14): p. R499-r501.
229. Pronobis, M.I., N.M. Rusan, and M. Peifer, *A novel GSK3-regulated APC:Axin interaction regulates Wnt signaling by driving a catalytic cycle of efficient betacatenin destruction*. Elife, 2015. **4**: p. e08022.
230. Hart, M.J., et al., *Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 β* . Curr Biol, 1998. **8**(10): p. 573-81.
231. Moon, R.T., et al., *WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(9): p. 691-701.
232. Grainger, S. and K. Willert, *Mechanisms of Wnt signaling and control*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2018: p. e1422.
233. Anastas, J.N. and R.T. Moon, *WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(1): p. 11-26.
234. Nishisho, I., et al., *Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients*. Science, 1991. **253**(5020): p. 665-9.
235. Kinzler, K.W., et al., *Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21*. Science, 1991. **253**(5020): p. 661-5.
236. Wodarz, A. and R. Nusse, *Mechanisms of Wnt signaling in development*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998. **14**: p. 59-88.

237. Bilic, J., et al., *Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation*. Science, 2007. **316**(5831): p. 1619-22.
238. He, X., et al., *LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way*. Development, 2004. **131**(8): p. 1663-77.
239. Wu, C.H. and R. Nusse, *Ligand receptor interactions in the Wnt signaling pathway in Drosophila*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 41762-9.
240. Klingensmith, J., R. Nusse, and N. Perrimon, *The Drosophila segment polarity gene dishevelled encodes a novel protein required for response to the wingless signal*. Genes Dev, 1994. **8**(1): p. 118-30.
241. Rubinfeld, B., et al., *Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly*. Science, 1996. **272**(5264): p. 1023-6.
242. Doble, B.W., et al., *Functional redundancy of GSK-3alpha and GSK-3beta in Wnt/beta-catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines*. Dev Cell, 2007. **12**(6): p. 957-71.
243. Ikeda, S., et al., *Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin*. Embo j, 1998. **17**(5): p. 1371-84.
244. Behrens, J., et al., *Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta*. Science, 1998. **280**(5363): p. 596-9.
245. Peifer, M. and P. Polakis, *Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus*. Science, 2000. **287**(5458): p. 1606-9.
246. Aberle, H., et al., *beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway*. Embo j, 1997. **16**(13): p. 3797-804.
247. Behrens, J., et al., *Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1*. Nature, 1996. **382**(6592): p. 638-42.
248. MacDonald, B.T., K. Tamai, and X. He, *Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases*. Dev Cell, 2009. **17**(1): p. 9-26.
249. Bienz, M. and H. Clevers, *Armadillo/beta-catenin signals in the nucleus--proof beyond a reasonable doubt?* Nat Cell Biol, 2003. **5**(3): p. 179-82.
250. Shtutman, M., et al., *The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(10): p. 5522-7.
251. Tetsu, O. and F. McCormick, *Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells*. Nature, 1999. **398**(6726): p. 422-6.
252. Zhang, S., et al., *Wnt/beta-catenin signaling pathway upregulates c-Myc expression to promote cell proliferation of P19 teratocarcinoma cells*. Anat Rec (Hoboken), 2012. **295**(12): p. 2104-13.
253. Artavanis-Tsakonas, S., M.D. Rand, and R.J. Lake, *Notch signaling: cell fate control and signal integration in development*. Science, 1999. **284**(5415): p. 770-6.
254. Irvine, K.D., *Fringe, Notch, and making developmental boundaries*. Curr Opin Genet Dev, 1999. **9**(4): p. 434-41.
255. Koch, U. and F. Radtke, *Notch and cancer: a double-edged sword*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(21): p. 2746-62.
256. Radtke, F. and K. Raj, *The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 756-67.
257. del Amo, F.F., et al., *Cloning, analysis, and chromosomal localization of Notch-1, a mouse homolog of Drosophila Notch*. Genomics, 1993. **15**(2): p. 259-64.

258. Weinmaster, G., V.J. Roberts, and G. Lemke, *Notch2: a second mammalian Notch gene*. Development, 1992. **116**(4): p. 931-41.
259. Lardelli, M., J. Dahlstrand, and U. Lendahl, *The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium*. Mech Dev, 1994. **46**(2): p. 123-36.
260. Uyttendaele, H., et al., *Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene*. Development, 1996. **122**(7): p. 2251-9.
261. Bettenhausen, B., et al., *Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to Drosophila Delta*. Development, 1995. **121**(8): p. 2407-18.
262. Dunwoodie, S.L., et al., *Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo*. Development, 1997. **124**(16): p. 3065-76.
263. Shutter, J.R., et al., *Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium*. Genes Dev, 2000. **14**(11): p. 1313-8.
264. Lindsell, C.E., et al., *Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1*. Cell, 1995. **80**(6): p. 909-17.
265. Shawber, C., et al., *Jagged2: a serrate-like gene expressed during rat embryogenesis*. Dev Biol, 1996. **180**(1): p. 370-6.
266. Kopan, R. and M.X. Ilagan, *Gamma-secretase: proteasome of the membrane?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(6): p. 499-504.
267. Lai, E.C., *Notch signaling: control of cell communication and cell fate*. Development, 2004. **131**(5): p. 965-73.
268. Nam, Y., et al., *Structural requirements for assembly of the CSL.intracellular Notch1.Mastermind-like 1 transcriptional activation complex*. J Biol Chem, 2003. **278**(23): p. 21232-9.
269. Bailey, A.M. and J.W. Posakony, *Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity*. Genes Dev, 1995. **9**(21): p. 2609-22.
270. Kageyama, R. and T. Ohtsuka, *The Notch-Hes pathway in mammalian neural development*. Cell Res, 1999. **9**(3): p. 179-88.
271. Song, J.J., et al., *C-Myc regulation by Notch Signaling Modulates T Cell Differentiation*. The Journal of Immunology, 2016. **196**.
272. Palomero, T., et al., *NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(48): p. 18261-6.
273. Ronchini, C. and A.J. Capobianco, *Induction of Cyclin D1 Transcription and CDK2 Activity by Notchic: Implication for Cell Cycle Disruption in Transformation by Notchic*. Molecular and Cellular Biology, 2001. **21**(17): p. 5925-5934.
274. Palazzo, E., et al., *Notch Cooperates with Survivin to Maintain Stemness and to Stimulate Proliferation in Human Keratinocytes during Ageing*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(11): p. 26291-302.
275. Rangarajan, A., et al., *Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation*. Embo j, 2001. **20**(13): p. 3427-36.

276. Nosedá, M., et al., *Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(20): p. 8813-22.
277. Kageyama, R., T. Ohtsuka, and T. Kobayashi, *The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis*. Development, 2007. **134**(7): p. 1243-51.
278. Chen, H., et al., *Conservation of the Drosophila lateral inhibition pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 5355-60.
279. Kabos, P., A. Kabosova, and T. Neuman, *Blocking HES1 expression initiates GABAergic differentiation and induces the expression of p21(CIP1/WAF1) in human neural stem cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 8763-6.
280. Murata, K., et al., *Hes1 directly controls cell proliferation through the transcriptional repression of p27Kip1*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(10): p. 4262-71.
281. Kunnimalaiyaan, M., et al., *Overexpression of the NOTCH1 intracellular domain inhibits cell proliferation and alters the neuroendocrine phenotype of medullary thyroid cancer cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(52): p. 39819-30.
282. Somnay, Y.R., et al., *Chrysin suppresses achaete-scute complex-like 1 and alters the neuroendocrine phenotype of carcinoids*. Cancer Gene Ther, 2015. **22**(10): p. 496-505.
283. Altieri, D.C., *Validating survivin as a cancer therapeutic target*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(1): p. 46-54.
284. Ambrosini, G., C. Adida, and D.C. Altieri, *A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma*. Nat Med, 1997. **3**(8): p. 917-21.
285. Wu, X., et al., *Autophagy regulates Notch degradation and modulates stem cell development and neurogenesis*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 10533.
286. Oberg, C., et al., *The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog*. J Biol Chem, 2001. **276**(38): p. 35847-53.
287. Fryer, C.J., J.B. White, and K.A. Jones, *Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover*. Mol Cell, 2004. **16**(4): p. 509-20.
288. Qiu, L., et al., *Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 35734-7.
289. Foltz, D.R., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta modulates notch signaling and stability*. Curr Biol, 2002. **12**(12): p. 1006-11.
290. Kwon, C., et al., *Notch post-translationally regulates beta-catenin protein in stem and progenitor cells*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(10): p. 1244-51.
291. Espinosa, L., et al., *Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways*. J Biol Chem, 2003. **278**(34): p. 32227-35.
292. Ma, B. and M.O. Hottiger, *Crosstalk between Wnt/beta-Catenin and NF-kappaB Signaling Pathway during Inflammation*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 378.
293. Hayward, P., et al., *Notch modulates Wnt signalling by associating with Armadillo/beta-catenin and regulating its transcriptional activity*. Development, 2005. **132**(8): p. 1819-30.

294. Jin, Y.H., et al., *Beta-catenin modulates the level and transcriptional activity of Notch1/NICD through its direct interaction*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(2): p. 290-9.
295. Du, Q. and D.A. Geller, *Cross-Regulation Between Wnt and NF-kappaB Signaling Pathways*. For Immunopathol Dis Therap, 2010. **1**(3): p. 155-181.
296. Peignon, G., et al., *Complex interplay between beta-catenin signalling and Notch effectors in intestinal tumorigenesis*. Gut, 2011. **60**(2): p. 166-76.
297. Dan, H.C., et al., *Akt-dependent regulation of NF-kappaB is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK*. Genes Dev, 2008. **22**(11): p. 1490-500.
298. Zhao, L., J.Y. Lee, and D.H. Hwang, *The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway negatively regulates Nod2-mediated NF-kappaB pathway*. Biochem Pharmacol, 2008. **75**(7): p. 1515-25.
299. Arbibe, L., et al., *Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 533-40.
300. Guha, M. and N. Mackman, *The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 32124-32.
301. Park, Y.C., et al., *Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase, enhances LPS-induced NO production from murine peritoneal macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **240**(3): p. 692-6.
302. Wu, D. and W. Pan, *GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(3): p. 161-8.
303. Jin, Y.H., et al., *Regulation of Notch1/NICD and Hes1 expressions by GSK-3alpha/beta*. Mol Cells, 2009. **27**(1): p. 15-9.
304. Kopan, R. and M.X. Ilagan, *The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism*. Cell, 2009. **137**(2): p. 216-33.
305. Diehl, J.A., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization*. Genes Dev, 1998. **12**(22): p. 3499-511.
306. Watcharasit, P., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) binds to and promotes the actions of p53*. J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 48872-9.
307. Vaseva, A.V. and U.M. Moll, *The mitochondrial p53 pathway*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(5): p. 414-20.
308. Hemann, M.T. and S.W. Lowe, *The p53-Bcl-2 connection*. Cell Death Differ, 2006. **13**(8): p. 1256-9.
309. Miyashita, T. and J.C. Reed, *Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene*. Cell, 1995. **80**(2): p. 293-9.
310. Schuler, M. and D.R. Green, *Mechanisms of p53-dependent apoptosis*. Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 6): p. 684-8.
311. Wolter, K.G., et al., *Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis*. J Cell Biol, 1997. **139**(5): p. 1281-92.
312. Putcha, G.V., M. Deshmukh, and E.M. Johnson, Jr., *BAX translocation is a critical event in neuronal apoptosis: regulation by neuroprotectants, BCL-2, and caspases*. J Neurosci, 1999. **19**(17): p. 7476-85.

313. Zou, H., et al., *An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9*. J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 11549-56.
314. Mihara, M., et al., *p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria*. Mol Cell, 2003. **11**(3): p. 577-90.
315. Moll, U.M., et al., *Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(6): p. 631-6.
316. Sansome, C., et al., *Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria*. FEBS Letters, 2001. **488**: p. 110-115.
317. Hollstein, M., et al., *p53 mutations in human cancers*. Science, 1991. **253**(5015): p. 49-53.
318. Wieczorek, A.M., et al., *Structure-based rescue of common tumor-derived p53 mutants*. Nat Med, 1996. **2**(10): p. 1143-6.
319. Levine, A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. Cell, 1997. **88**(3): p. 323-31.
320. Marchenko, N.D., et al., *Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation*. Embo j, 2007. **26**(4): p. 923-34.
321. Caelles, C., A. Helmberg, and M. Karin, *p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes*. Nature, 1994. **370**(6486): p. 220-3.
322. Tang, Y., et al., *Acetylation is indispensable for p53 activation*. Cell, 2008. **133**(4): p. 612-26.
323. Watcharasit, P., et al., *Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3beta and p53 after DNA damage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 7951-5.
324. Eom, T.Y. and R.S. Jope, *GSK3 beta N-terminus binding to p53 promotes its acetylation*. Mol Cancer, 2009. **8**: p. 14.
325. Turenne, G.A. and B.D. Price, *Glycogen synthase kinase3 beta phosphorylates serine 33 of p53 and activates p53's transcriptional activity*. BMC Cell Biology, 2001. **2**(12).
326. Ngok-Ngam, P., et al., *Pharmacological inhibition of GSK3 attenuates DNA damage-induced apoptosis via reduction of p53 mitochondrial translocation and Bax oligomerization in neuroblastoma SH-SY5Y cells*. Cell Mol Biol Lett, 2013. **18**(1): p. 58-74.
327. Chu, B., et al., *Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1*. J Biol Chem, 1996. **271**(48): p. 30847-57.
328. Ryves, W.J., et al., *An assay for glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) for use in crude cell extracts*. Anal Biochem, 1998. **264**(1): p. 124-7.
329. Aristizabal Prada, E.T. and C.J. Auernhammer, *Targeted therapy of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: preclinical strategies and future targets*. Endocr Connect, 2018. **7**(1): p. R1-r25.
330. Auernhammer, C.J., et al., *[Current standards and novel developments in the treatment of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system]*. Dtsch Med Wochenschr, 2019. **144**(20): p. 1390-1395.
331. Dickey, A., et al., *GSK-3beta inhibition promotes cell death, apoptosis, and in vivo tumor growth delay in neuroblastoma Neuro-2A cell line*. J Neurooncol, 2011. **104**(1): p. 145-53.

332. Yin, Y., et al., *Glycogen synthase kinase 3 β inhibition as a therapeutic approach in the treatment of endometrial cancer*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(8): p. 16617-37.
333. Ougolkov, A.V., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 activity leads to epigenetic silencing of nuclear factor kappaB target genes and induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells*. Blood, 2007. **110**(2): p. 735-42.
334. Haruki, K., et al., *Glycogen synthase kinase-3 β activity plays a key role in the antitumor effect of nafamostat mesilate in pancreatic cancer cells*. Ann Gastroenterol Surg, 2018. **2**(1): p. 65-71.
335. Acikgoz, E., et al., *Glycogen synthase kinase-3 inhibition in glioblastoma multiforme cells induces apoptosis, cell cycle arrest and changing biomolecular structure*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2019. **209**: p. 150-164.
336. Nölting, S., et al., *Combined blockade of signalling pathways shows marked anti-tumour potential in pheochromocytoma cell lines*. J Mol Endocrinol, 2012. **49**(2): p. 79-96.
337. Fliedner, S.M., et al., *Anti-cancer potential of MAPK pathway inhibition in paragangliomas-effect of different statins on mouse pheochromocytoma cells*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97712.
338. Nölting, S., et al., *Additive Anti-Tumor Effects of Lovastatin and Everolimus In Vitro through Simultaneous Inhibition of Signaling Pathways*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0143830.
339. Ren, J., et al., *GSK-3 β inhibits autophagy and enhances radiosensitivity in non-small cell lung cancer*. Diagn Pathol, 2018. **13**(1): p. 33.
340. Shimura, T., *Acquired radioresistance of cancer and the AKT/GSK3 β /cyclin D1 overexpression cycle*. J Radiat Res, 2011. **52**(5): p. 539-44.
341. Revheim, M.E., et al., *Establishment and characterization of a human gastrointestinal stromal tumour (GIST) xenograft in athymic nude mice*. Anticancer Res, 2009. **29**(11): p. 4331-6.
342. Kaku, M., et al., *Establishment of a carcinoembryonic antigen-producing cell line from human pancreatic carcinoma*. Gan, 1980. **71**(5): p. 596-601.
343. Cakir, M. and A. Grossman, *The molecular pathogenesis and management of bronchial carcinoids*. Expert Opin Ther Targets, 2011. **15**(4): p. 457-91.
344. Kolby, L., et al., *A transplantable human carcinoid as model for somatostatin receptor-mediated and amine transporter-mediated radionuclide uptake*. Am J Pathol, 2001. **158**(2): p. 745-55.
345. Bhat, R., et al., *Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418*. J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 45937-45.
346. Kramer, T., B. Schmidt, and F. Lo Monte, *Small-Molecule Inhibitors of GSK-3: Structural Insights and Their Application to Alzheimer's Disease Models*. Int J Alzheimers Dis, 2012. **2012**: p. 381029.
347. Madhunapantula, S.V., et al., *Identification of glycogen synthase kinase 3 α as a therapeutic target in melanoma*. Pigment Cell Melanoma Res, 2013. **26**(6): p. 886-99.
348. King, M.R., et al., *Glycogen synthase kinase-3 inhibition prevents learning deficits in diabetic mice*. J Neurosci Res, 2013. **91**(4): p. 506-14.

349. Gould, T.D., et al., *AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test*. Int J Neuropsychopharmacol, 2004. **7**(4): p. 387-90.
350. Mazzardo-Martins, L., et al., *Glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418 decreases neuropathic pain in mice: evidence for the mechanisms of action*. Neuroscience, 2012. **226**: p. 411-20.
351. Yadav, A.K., et al., *AR-A 014418 Used against GSK3beta Downregulates Expression of hnRNPA1 and SF2/ASF Splicing Factors*. J Oncol, 2014. **2014**: p. 695325.
352. Shimasaki, T., et al., *Glycogen synthase kinase 3beta inhibition sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine*. J Gastroenterol, 2012. **47**(3): p. 321-33.
353. Zitzmann, K., et al., *The novel mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) induces antiproliferative effects in human pancreatic neuroendocrine tumor cells*. Neuroendocrinology, 2007. **85**(1): p. 54-60.
354. Aristizabal Prada, E.T., et al., *The Novel Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor Ribociclib (LEE011) Alone and in Dual-Targeting Approaches Demonstrates Antitumoral Efficacy in Neuroendocrine Tumors in vitro*. Neuroendocrinology, 2017.
355. Reuther, C., et al., *The HDM2 (MDM2) Inhibitor NVP-CGM097 Inhibits Tumor cell Proliferation and Shows Additive Effects with 5-Fluorouracil on the p53 - p21 - Rb - E2F1 Cascade in the p53wildtype Neuroendocrine Tumor Cell Line GOT1*. Neuroendocrinology, 2016.
356. Pavel, M.E. and C. Sers, *WOMEN IN CANCER THEMATIC REVIEW: Systemic therapies in neuroendocrine tumors and novel approaches toward personalized medicine*. Endocr Relat Cancer, 2016. **23**(11): p. T135-T154.
357. Aristizabal Prada, E.T., et al., *The novel cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor ribociclib (LEE011) alone and in dual-targeting approaches demonstrates antitumoral efficacy in neuroendocrine tumors in vitro*. Journal of Neuroendocrinology, 2017.
358. Yoshino, Y. and C. Ishioka, *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 beta induces apoptosis and mitotic catastrophe by disrupting centrosome regulation in cancer cells*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 13249.
359. Ito, H., et al., *GSK-3 directly regulates phospho-4EBP1 in renal cell carcinoma cell-line: an intrinsic subcellular mechanism for resistance to mTORC1 inhibition*. BMC Cancer, 2016. **16**: p. 393.
360. Gray, J.E., et al., *A first-in-human phase I dose-escalation, pharmacokinetic, and pharmacodynamic evaluation of intravenous LY2090314, a glycogen synthase kinase 3 inhibitor, administered in combination with pemetrexed and carboplatin*. Invest New Drugs, 2015. **33**(6): p. 1187-96.
361. Goodwin, F.K. and K.R. Jamison, *Manic-Depressive Illness: Bipolar Disorders and Recurrent Depression*. 2007, New York: Oxford University Press.
362. Wijeratne, C. and B. Draper, *Reformulation of current recommendations for target serum lithium concentration according to clinical indication, age and physical comorbidity*. Aust N Z J Psychiatry, 2011. **45**(12): p. 1026-32.
363. Jaskula-Sztul, R., et al., *Tumor-suppressor role of Notch3 in medullary thyroid carcinoma revealed by genetic and pharmacological induction*. Mol Cancer Ther, 2015. **14**(2): p. 499-512.

364. Miele, L., T. Golde, and B. Osborne, *Notch signaling in cancer*. Curr Mol Med, 2006. **6**(8): p. 905-18.
365. Rizzo, P., et al., *Rational targeting of Notch signaling in cancer*. Oncogene, 2008. **27**(38): p. 5124-31.
366. Kunnimalaiyaan, M., et al., *Hairy Enhancer of Split-1 (HES-1), a Notch1 effector, inhibits the growth of carcinoid tumor cells*. Surgery, 2005. **138**(6): p. 1137-42; discussion 1142.
367. Nakakura, E.K., et al., *Regulation of neuroendocrine differentiation in gastrointestinal carcinoid tumor cells by notch signaling*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(7): p. 4350-6.
368. Kunnimalaiyaan, M. and H. Chen, *Tumor suppressor role of Notch-1 signaling in neuroendocrine tumors*. Oncologist, 2007. **12**(5): p. 535-42.
369. Wang, H., et al., *Heterogeneity in signaling pathways of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: a critical look at notch signaling pathway*. Mod Pathol, 2013. **26**(1): p. 139-47.
370. Greenblatt, D.Y., et al., *Valproic acid activates notch-1 signaling and regulates the neuroendocrine phenotype in carcinoid cancer cells*. Oncologist, 2007. **12**(8): p. 942-51.
371. Kunnimalaiyaan, M., K. Traeger, and H. Chen, *Conservation of the Notch1 signaling pathway in gastrointestinal carcinoid cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **289**(4): p. G636-42.
372. Evangelisti, C., et al., *Crosstalks of GSK3 signaling with the mTOR network and effects on targeted therapy of cancer*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2020. **1867**(4): p. 118635.
373. Faivre, S., G. Kroemer, and E. Raymond, *Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(8): p. 671-88.
374. Yee, K.W., et al., *Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(17): p. 5165-73.
375. Vignot, S., et al., *mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives*. Ann Oncol, 2005. **16**(4): p. 525-37.
376. Kirchner, G.I., I. Meier-Wiedenbach, and M.P. Manns, *Clinical pharmacokinetics of everolimus*. Clin Pharmacokinet, 2004. **43**(2): p. 83-95.
377. Aristizabal Prada, E.T., et al., *The role of GSK3 and its reversal with GSK3 antagonism in everolimus resistance*. Endocr Relat Cancer, 2018. **25**(10): p. 893-908.
378. Zitzmann, K., et al., *Compensatory activation of Akt in response to mTOR and Raf inhibitors - a rationale for dual-targeted therapy approaches in neuroendocrine tumor disease*. Cancer Lett, 2010. **295**(1): p. 100-9.
379. Iida, S., et al., *Synergistic anti-tumor effects of RAD001 with MEK inhibitors in neuroendocrine tumors: a potential mechanism of therapeutic limitation of mTOR inhibitor*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **350**(1): p. 99-106.
380. Carracedo, A., et al., *Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer*. J Clin Invest, 2008. **118**(9): p. 3065-74.
381. Nölting, S., et al., *Combination of 13-Cis retinoic acid and lovastatin: marked antitumor potential in vivo in a pheochromocytoma allograft model in female athymic nude mice*. Endocrinology, 2014. **155**(7): p. 2377-90.

382. Holstein, S.A., et al., *Pharmacodynamic effects of high dose lovastatin in subjects with advanced malignancies*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006. **57**(2): p. 155-64.
383. Bilim, V., et al., *Glycogen synthase kinase-3: a new therapeutic target in renal cell carcinoma*. *Br J Cancer*, 2009. **101**(12): p. 2005-14.
384. Strosberg, J., et al., *The Role of Chemotherapy in Well-Differentiated Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors*. *Front Horm Res*, 2015. **44**: p. 239-47.
385. Fu, Y., et al., *Overexpression of glycogen synthase kinase-3 in ovarian carcinoma cells with acquired paclitaxel resistance*. *Int J Gynecol Cancer*, 2011. **21**(3): p. 439-44.
386. Ougolkov, A.V. and D.D. Billadeau, *Targeting GSK-3: a promising approach for cancer therapy?* *Future Oncol*, 2006. **2**(1): p. 91-100.
387. Joep, R.S., C.J. Yuskaitis, and E. Beurel, *Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics*. *Neurochem Res*, 2007. **32**(4-5): p. 577-95.
388. Munnich, N., et al., *Expression of the zinc importer protein ZIP9/SLC39A9 in glioblastoma cells affects phosphorylation states of p53 and GSK-3beta and causes increased cell migration*. *Biometals*, 2016. **29**(6): p. 995-1004.
389. Magi, S., E. Tashiro, and M. Imoto, *A chemical genomic study identifying diversity in cell migration signaling in cancer cells*. *Sci Rep*, 2012. **2**: p. 823.
390. Verheyen, E.M. and C.J. Gottardi, *Regulation of Wnt/beta-catenin signaling by protein kinases*. *Dev Dyn*, 2010. **239**(1): p. 34-44.
391. Wang, R., et al., *Notch and Wnt/ β -catenin signaling pathway play important roles in activating liver cancer stem cells*. *Oncotarget*, 2015. **7**(5): p. 5755-5768.
392. Klaus, A. and W. Birchmeier, *Wnt signalling and its impact on development and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(5): p. 387-98.
393. Iwai, S., et al., *Involvement of the Wnt-beta-catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells*. *Int J Oncol*, 2010. **37**(5): p. 1095-103.
394. Liu, L., et al., *Activation of beta-catenin by hypoxia in hepatocellular carcinoma contributes to enhanced metastatic potential and poor prognosis*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(10): p. 2740-50.
395. Zhan, T., N. Rindtorff, and M. Boutros, *Wnt signaling in cancer*. *Oncogene*, 2017. **36**(11): p. 1461-1473.
396. Besson, A., et al., *p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation*. *Genes Dev*, 2004. **18**(8): p. 862-76.
397. Lee, E.Y., et al., *Effect of p27 on motility of MDA-MB-231 breast cancer cells*. *Oncol Rep*, 2009. **21**(6): p. 1621-5.
398. Grabowski, P., et al., *Loss of nuclear p27 expression and its prognostic role in relation to cyclin E and p53 mutation in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(22): p. 7378-84.
399. Thotala, D.K., D.E. Hallahan, and E.M. Yazlovitskaya, *Inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta attenuates neurocognitive dysfunction resulting from cranial irradiation*. *Cancer Res*, 2008. **68**(14): p. 5859-68.

400. Cross, D.A., et al., *Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death*. J Neurochem, 2001. **77**(1): p. 94-102.
401. Thotala, D.K., D.E. Hallahan, and E.M. Yazlovitskaya, *Glycogen synthase kinase 3beta inhibitors protect hippocampal neurons from radiation-induced apoptosis by regulating MDM2-p53 pathway*. Cell Death Differ, 2012. **19**(3): p. 387-96.
402. Watson, R.L., et al., *GSK3 β and β -Catenin Modulate Radiation Cytotoxicity in Pancreatic Cancer*. Neoplasia, 2010. **12**(5): p. 357-365.
403. Mita, M.M., A. Mita, and E.K. Rowinsky, *The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer*. Cancer Biol Ther, 2003. **2**(4 Suppl 1): p. S169-77.
404. Chung, D.C., et al., *Overexpression of cyclin D1 occurs frequently in human pancreatic endocrine tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(11): p. 4373-8.
405. Tang, L.H., et al., *Attenuation of the retinoblastoma pathway in pancreatic neuroendocrine tumors due to increased cdk4/cdk6*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(17): p. 4612-20.
406. Naderi, S., et al., *cAMP-induced degradation of cyclin D3 through association with GSK-3beta*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 17): p. 3769-83.
407. Liu, Q., et al., *Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint*. Genes Dev, 2000. **14**(12): p. 1448-59.
408. Xiao, Z., et al., *Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents*. J Biol Chem, 2003. **278**(24): p. 21767-73.
409. Zhang, Y. and T. Hunter, *Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy*. Int J Cancer, 2014. **134**(5): p. 1013-23.
410. Bucher, N. and C.D. Britten, *G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer*. Br J Cancer, 2008. **98**(3): p. 523-8.
411. Gartel, A.L. and S.K. Radhakrishnan, *Lost in Transcription: p21 Repression, Mechanisms, and Consequences*. Cancer Res, 2005. **65**(10): p. 3980-3985.
412. Zhang, Y., et al., *Integrated High Throughput Analysis Identifies GSK3 as a Crucial Determinant of p53-Mediated Apoptosis in Lung Cancer Cells*. Cell Physiol Biochem, 2017. **42**(3): p. 1177-1191.
413. Nishimura, H., et al., *GSK-3 inhibitor inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human osteosarcoma cells*. Oncol Rep, 2016. **35**(4): p. 2348-54.
414. Jendzelovsky, R., et al., *Inhibition of GSK-3beta reverses the pro-apoptotic effect of proadifen (SKF-525A) in HT-29 colon adenocarcinoma cells*. Toxicol In Vitro, 2012. **26**(6): p. 775-82.
415. Yuan, Z., A. Agarwal-Mawal, and H.K. Paudel, *14-3-3 binds to and mediates phosphorylation of microtubule-associated tau protein by Ser9-phosphorylated glycogen synthase kinase 3beta in the brain*. J Biol Chem, 2004. **279**(25): p. 26105-14.
416. Nomura, M., et al., *14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax*. J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 2058-65.

417. Miyake, N., et al., *Rapamycin induces p53-independent apoptosis through the mitochondrial pathway in non-small cell lung cancer cells*. *Oncol Rep*, 2012. **28**(3): p. 848-54.
418. Jiang, M. and J. Milner, *Bcl-2 constitutively suppresses p53-dependent apoptosis in colorectal cancer cells*. *Genes & Development*, 2003. **17**: p. 832-837.
419. Vandamme, T., et al., *Whole-exome characterization of pancreatic neuroendocrine tumor cell lines BON-1 and QGP-1*. *J Mol Endocrinol*, 2015. **54**(2): p. 137-47.
420. Lai, S.L., R.P. Perng, and J. Hwang, *p53 gene status modulates the chemosensitivity of non-small cell lung cancer cells*. *J Biomed Sci*, 2000. **7**(1): p. 64-70.
421. Boora, G.K., et al., *Exome-level comparison of primary well-differentiated neuroendocrine tumors and their cell lines*. *Cancer Genet*, 2015. **208**(7-8): p. 374-81.
422. Przygodzki, R.M., et al., *Analysis of p53, K-ras-2, and C-raf-1 in Pulmonary Neuroendocrine Tumors*. *American Journal of Pathology*, 1996. **148**(5).
423. Lohmann, D.R., et al., *Infrequent mutations of the p53 gene in pulmonary carcinoid tumors*. *Cancer Res*, 1993. **53**(23): p. 5797-801.
424. Vollbrecht, C., et al., *Mutational analysis of pulmonary tumours with neuroendocrine features using targeted massive parallel sequencing: a comparison of a neglected tumour group*. *Br J Cancer*, 2015. **113**(12): p. 1704-11.
425. Fernandez-Cuesta, L., et al., *Frequent mutations in chromatin-remodelling genes in pulmonary carcinoids*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 3518.
426. Bartz, C., et al., *p53 Tumor suppressor gene expression in pancreatic neuroendocrine tumour cells*. *Gut*, 1996. **38**: p. 403-409.
427. Lohmann, D.R., et al., *Identification of p53 gene mutations in gastrointestinal and pancreatic carcinoids by nonradioisotopic SSCP*. *Virchows Archiv B Cell Pathology*, 1993. **64**: p. 293-296.
428. Mills, C.N., et al., *Emerging roles of glycogen synthase kinase 3 in the treatment of brain tumors*. *Front Mol Neurosci*, 2011. **4**: p. 47.
429. Höpfner, M., D. Schuppan, and H. Scherübl, *Treatment of gastrointestinal neuroendocrine tumors with inhibitors of growth factor receptors and their signaling pathways: Recent advances and future perspectives*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(16): p. 2461-2473.
430. Hobday, T.J., et al., *A phase II trial of gefitinib in patients (pts) with progressive metastatic neuroendocrine tumors (NET): A Phase II Consortium (P2C) study*. *Journal of Clinical Oncology*, 2006. **24**(18_suppl): p. 4043-4043.
431. Pollak, M.N., E.S. Schernhammer, and S.E. Hankinson, *Insulin-like growth factors and neoplasia*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(7): p. 505-18.
432. Arcaro, A., *Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor in human cancer*. *Front Pharmacol*, 2013. **4**: p. 30.
433. Moschos, S.J. and C.S. Mantzoros, *The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications*. *Oncology*, 2002. **63**(4): p. 317-32.

- 434. Casanovas, O., et al., *Study on activation of the IGF-1R mTOR pathway in neuroendocrine tumours (NETs)*. Journal of Clinical Oncology, 2013. **31**(15_suppl): p. 4139-4139.
- 435. Huo, X., et al., *GSK3 protein positively regulates type I insulin-like growth factor receptor through forkhead transcription factors FOXO1/3/4*. J Biol Chem, 2014. **289**(36): p. 24759-70.
- 436. Dasari, A., et al., *Phase I study of the anti-IGF1R antibody cixutumumab with everolimus and octreotide in advanced well-differentiated neuroendocrine tumors*. Endocr Relat Cancer, 2015. **22**(3): p. 431-41.
- 437. Libutti, S.K., *Therapy: Blockage of IGF-1R - not effective in neuroendocrine tumors*. Nature Reviews Endocrinology, 2013. **9**: p. 389-390.

V) Anhang

Tabellen

Zellen pro Well	Zellsuspension	Benötigtes Volumen pro Well
200	10.000 Zellen/ml	20 µl
300	10.000 Zellen/ml	30 µl
400	10.000 Zellen/ml	40 µl
600	10.000 Zellen/ml	60 µl
800	10.000 Zellen/ml	80 µl
1.000	10.000 Zellen/ml	100 µl
1.500	10.000 Zellen/ml	150 µl
2.000	10.000 Zellen/ml	200 µl
4.000	100.000 Zellen/ml	40 µl
6.000	100.000 Zellen/ml	60 µl
8.000	100.000 Zellen/ml	80 µl
10.000	100.000 Zellen/ml	100 µl
12.000	100.000 Zellen/ml	120 µl
20.000	100.000 Zellen/ml	200 µl
40.000	1.000.000 Zellen/ml	40 µl
50.000	1.000.000 Zellen/ml	50 µl
60.000	1.000.000 Zellen/ml	60 µl
100.000	1.000.000 Zellen/ml	100 µl
200.000	1.000.000 Zellen/ml	200 µl
400.000	1.000.000 Zellen/ml	400 µl

Anhang Tabelle 1: Zellsuspensionen Bestrahlung. Angaben zur Herstellung der Zellsuspensionen sowie die benötigten Volumenangaben pro Well für die jeweilig gewünschte Zellzahl bei der Bestrahlung.

72 h	KD	AR 5 µM	AR 10 µM	AR 20 µM	AR 30 µM	AR 40 µM	AR 50 µM	AR 75 µM	AR 100 µM	IC ₅₀ [µM]
BON1	100%	95%**	91%***	75%***	64%***	58%***	48%***	48%***	46%***	48
QGP1	100%	109%***	108%***	103%*	85%***	71%***	67%***	59%***	53%***	> 100
H727	100%	96%*	93%**	90%***	84%***	86%**	84%***	84%***	84%***	> 100
GOT1	100%	99%	88%***	56%***	14%***	8%***	7%***	10%***	6%***	17

(AR = AR-A014418; KD = DMSO-Kontrolle)

Anhang Tabelle 2: Zellüberleben nach 72 h AR-A014418-Inkubation [1].

Gezeigt sind jeweils der prozentuale Anteil der überlebenden Zellen mit Signifikanzangaben aller vier untersuchten Zelllinien nach 72 h AR-A014418-Einzelbehandlung [1].

(AR =	BON1	KD	E 10 nM	AR 0,62 5 µM	AR 1,25 µM	AR 2,5 µM	AR 10 µM	AR 20 µM	AR 0,62 5 µM + E	AR 1,25 µM + E	AR 2,5 µM + E	AR 10 µM + E	AR 20 µM + E
	72 h	100 %	53 %	109 %	107 %	111 %	103 %	88 %	53%	61 %	57 %	62%	63%
	144 h	100 %	62 %	99%	99%	97%	67%	53 %	62%	64 %	63 %	60% +	41% +

AR-A014418; E = Everolimus 10 nM; KD = DMSO-Kontrolle;
„+“ = p< 0,05)

Anhang Tabelle 3: Zellüberleben nach AR-A014418- und Everolimus-Gabe in BON1-Zellen [1].

Gezeigt sind jeweils der prozentuale Anteil der überlebenden Zellen in BON1-Zellen nach 72 h und 144 h und den Kombinationsbehandlungen mit 0,625 µM – 20 µM AR-A014418 plus 10 nM Everolimus [1].

QGP1	KD	E 10 nM	AR 0,625 µM	AR 1,25 µM	AR 2,5 µM	AR 10 µM	AR 20 µM	AR 0,625 µM + E	AR 1,25 µM + E	AR 2,5 µM + E	AR 10 µM + E	AR 20 µM + E
72 h	100%	70%	108%	105%	102%	87%	89%	69%	73%	67%	66%	66%
144 h	100%	72%	112%	103%	102%	88%	96%	68% ⁺	71%	67%	62% ⁺	77% ⁺

(AR = AR-A014418; E = Everolimus 10 nM; KD = DMSO-Kontrolle;
„+“ = p< 0,05)

Anhang Tabelle 4: Zellüberleben nach AR-A014418- und Everolimus-Gabe in QGP1-Zellen [1].

Gezeigt sind jeweils der prozentuale Anteil der überlebenden Zellen in QGP1-Zellen nach 72 h und 144 h und den Kombinationsbehandlungen mit 0,625 µM – 20 µM AR-A014418 plus 10 nM Everolimus [1].

H727	KD	E 10 nM	AR 0,625 µM	AR 1,25 µM	AR 2,5 µM	AR 10 µM	AR 20 µM	AR 0,62 5 µM + E	AR 1,25 µM + E	AR 2,5 µM + E	AR 10 µM + E	AR 20 µM + E
72 h	100%	85%	107%	102%	103%	94%	90%	77%	81%	81%	77%	75%
144 h	100%	69%	104%	102%	97%	84%	72%	69% ⁺	69%	70%	64%	54% ⁺

(AR = AR-A014418; E = Everolimus 10 nM; KD = DMSO-Kontrolle;
„+“ = p< 0,05)

Anhang Tabelle 5: Zellüberleben nach AR-A014418- und Everolimus-Gabe in H727-Zellen [1]. Gezeigt sind jeweils der prozentuale Anteil der überlebenden Zellen in H727-Zellen nach 72 h und 144 h und den Kombinationsbehandlungen mit 0,625 µM – 20 µM AR-A014418 plus 10 nM Everolimus [1].

BON1	KD	L 10 µM	AR 2,5 µM	AR 5 µM	AR 10 µM	AR 15 µM	AR 20 µM	AR 2,5 µM + L	AR 5 µM + L	AR 10 µM + L	AR 15 µM + L	AR 20 µM + L
72 h	100%	111%	101%	94%	95%	89%	82%	102 %	109%	98%	92%	79%
144 h	100%	94%	94%	81%	67%	62%	57%	83% ⁺	80%	64%	58%	40% ⁺

(AR = AR-A014418; L = Lovastatin 10 µM; KD = DMSO-Kontrolle;
„+“ = p< 0,05)

Anhang Tabelle 6: Zellüberleben nach AR-A014418- und Lovastatin-Gabe in BON1-Zellen [1]. Gezeigt sind jeweils der prozentuale Anteil der überlebenden Zellen in BON1-Zellen nach 72 h und 144 h und den Kombinationsbehandlungen mit 2,5 µM – 20 µM AR-A014418 plus 10 µM Lovastatin [1].

QGP1	KD	L 10 µM	AR 2,5 µM	AR 5 µM	AR 10 µM	AR 15 µM	AR 20 µM	AR 2,5 µM + L	AR 5 µM + L	AR 10 µM + L	AR 15 µM + L	AR 20 µM + L
72 h	100%	91%	110%	111%	104%	103%	98%	92%	87%	82%	82%	82%
144 h	100%	78%	100%	93%	89%	93%	95%	72% ⁺	66% ⁺	66% ⁺	72% ⁺	73%

(AR = AR-A014418; L = Lovastatin 10 µM; KD = DMSO-Kontrolle;
„+“ = p< 0,05)

Anhang Tabelle 7: Zellüberleben nach AR-A014418- und Lovastatin-Gabe in QGP1-Zellen [1]. Gezeigt sind jeweils der prozentuale Anteil der überlebenden Zellen in QGP1-Zellen nach 72 h und 144 h und den Kombinationsbehandlungen mit 2,5 µM – 20 µM AR-A014418 plus 10 µM Lovastatin [1].

H727	KD	L 10 µM	AR 2,5 µM	AR 5 µM	AR 10 µM	AR 15 µM	AR 20 µM	AR 2,5 µM + L	AR 5 µM + L	AR 10 µM + L	AR 15 µM + L	AR 20 µM + L
72 h	100%	90%	104%	102%	97%	93%	89%	87%	86%	84%	78%	80%
144 h	100%	71%	99%	98%	91%	85%	68%	75%	71%	67%	61%	56% ⁺

(AR = AR-A014418; L = Lovastatin 10 µM; KD = DMSO-Kontrolle;
„+“ = p < 0,05)

Anhang Tabelle 8: Zellüberleben nach AR-A014418- und Lovastatin-Gabe in H727-Zellen [1]. Gezeigt sind jeweils der prozentuale Anteil der überlebenden Zellen in H727-Zellen nach 72 h und 144 h und den Kombinationsbehandlungen mit 2,5 µM – 20 µM AR-A014418 plus 10 µM Lovastatin [1].

BON1	KD	5-FU 5 µM	AR 2,5 µM	AR 5 µM	AR 10 µM	AR 15 µM	AR 20 µM	AR 2,5 µM + 5-FU	AR 5 µM + 5-FU	AR 10 µM + 5-FU	AR 15 µM + 5-FU	AR 20 µM + 5-FU
72 h	100%	71%	101%	95%	95%	92%	89%	61%	60%	59%	52%	54%
144 h	100%	46%	96%	87%	75%	70%	64%	44%	43%	43% ⁺	39% ⁺	34% ⁺

(AR = AR-A014418; 5-FU = 5-FU 5 µM; KD = DMSO-Kontrolle;
„+“ = p < 0,05)

Anhang Tabelle 9: Zellüberleben nach AR-A014418- und 5-FU-Gabe in BON1-Zellen [1]. Gezeigt sind jeweils der prozentuale Anteil der überlebenden Zellen in BON1-Zellen nach 72 h und 144 h und den Kombinationsbehandlungen mit 2,5 µM – 20 µM AR-A014418 plus 5 µM 5-FU [1].

QGP1	KD	5-FU 5 µM	AR 2,5 µM	AR 5 µM	AR 10 µM	AR 15 µM	AR 20 µM	AR 2,5 µM + 5-FU	AR 5 µM + 5-FU	AR 10 µM + 5-FU	AR 15 µM + 5-FU	AR 20 µM + 5-FU
72 h	100%	102%	108%	98%	94%	87%	84%	92%	87%	81%	79%	75%
144 h	100%	83%	106%	96%	93%	95%	94%	76% ⁺	68% ⁺	65% ⁺	62% ⁺	61% ⁺

(AR = AR-A014418; 5-FU = 5-FU 5 µM; KD = DMSO-Kontrolle;
„+“ = p < 0,05)

Anhang Tabelle 10: Zellüberleben nach AR-A014418- und 5-FU-Gabe in QGP1-Zellen [1]. Gezeigt sind jeweils der prozentuale Anteil der überlebenden Zellen in QGP1-Zellen nach 72 h und 144 h und den Kombinationsbehandlungen mit 2,5 µM – 20 µM AR-A014418 plus 5 µM 5-FU [1].

H727	KD	5-FU 5 µM	AR 2,5 µM	AR 5 µM	AR 10 µM	AR 15 µM	AR 20 µM	AR 2,5 µM + 5-FU	AR 5 µM + 5-FU	AR 10 µM + 5-FU	AR 15 µM + 5-FU	AR 20 µM + 5-FU
72 h	100%	84%	100%	99%	99%	95%	94%	83%	81%	78%	76%	70%
144 h	100%	73%	97%	93%	86%	82%	68%	73%	68%	63%	54%	43%

(AR = AR-A014418; 5-FU = 5-FU 5 µM; KD = DMSO-Kontrolle)

Anhang Tabelle 11: Zellüberleben nach AR-A014418- und 5-FU-Gabe in H727-Zellen [1]. Gezeigt sind jeweils der prozentuale Anteil der überlebenden Zellen in H727-Zellen nach 72 h und 144 h und den Kombinationsbehandlungen mit 2,5 µM – 20 µM AR-A014418 plus 5 µM 5-FU [1].

Dose [Gy]	Control [%]	1 µM AR [%]	2 µM AR [%]
BON1			
0	100,00	100,00	100,00
1	84,76	63,22	78,74
2	49,92	39,17	53,86
4	12,15	12,12	14,07
6	2,67	2,01	2,17
8	0,28	0,11	0,05 *
10	0,01	0,01	0,01

(AR = AR-A014418; Control = DMSO-Kontrolle)

Anhang Tabelle 12: Bestrahlung nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1]. Gezeigt sind die Werte für 1 µM und 2 µM AR-A014418 nach einer Bestrahlung mit 0 Gy bis 10 Gy in BON1-Zellen. Es zeigte sich lediglich nach einer Vorbehandlung mit 2 µM AR-A014418 und einer darauffolgenden Bestrahlungsdosis von 8 Gy ein leichter, signifikanter radiosensibilisierender Effekt [1].

Dose [Gy]	Control [%]	1 µM AR [%]	2 µM AR [%]
QGP1			
0	100,00	100,00	100,00
1	89,32	70,33	66,89 **
2	64,14	88,69 *	72,20
4	24,80	23,23	17,56
6	5,25	2,18 **	1,33 **
8	0,24	0,01 **	0,02 **
10	0,00	0,00	0,00

(AR = AR-A014418; Control = DMSO-Kontrolle)

Anhang Tabelle 13: *Bestrahlung nach AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1].* Gezeigt sind die Werte für 1 µM und 2 µM AR-A014418-Vorbehandlung und nach einer Bestrahlung mit 0 Gy bis 10 Gy in QGP1-Zellen. Es zeigte sich bei einer AR-A014418-Vorbehandlung mit 1 µM und 2 µM und einer Bestrahlungsdosis von 6 Gy oder 8 Gy ein leichter, signifikanter radiosensibilisierender Effekt, ebenso wie bei 1 µM AR-A014418 mit 2 Gy und 2 µM AR-A014418 mit 1 Gy Bestrahlungsdosis [1].

Dose [Gy]	Control [%]	1 µM AR [%]	2 µM AR [%]
H727			
0	100,00	100,00	100,00
1	71,90	84,39	92,58
2	58,76	63,89	61,67
4	22,81	24,51	21,19
6	3,53	2,56	2,52
8	0,18	0,03	0,04
10	0,02	0,02	0,00

(AR = AR-A014418; Control = DMSO-Kontrolle)

Anhang Tabelle 14: *Bestrahlung nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1].* Gezeigt sind die Werte für 1 µM und 2 µM AR-A014418-Vorbehandlung nach einer Bestrahlung mit 0 Gy bis 10 Gy in H727-Zellen. Es zeigte sich weder bei einer AR-A014418-Vorbehandlung mit 1 µM noch mit 2 µM ein signifikanter Effekt nach Bestrahlung [1].

72 h	KD	AR 5 µM	AR 10 µM	AR 20 µM
BON1	100%	71%	66%*	53% **
QGP1	100%	104%	100%	63% *
H727	100%	71% **	109%	331% **
GOT1	100%	108%	124% *	527% **

(AR = AR-A014418; KD = DMSO-Kontrolle)

Anhang Tabelle 15: *Caspase-Aktivität nach 72 h AR-A014418-Inkubation [1].* Gezeigt sind die Aktivitäten der Caspasen 3 und 9 mit Angabe der Signifikanzen in BON1-, QGP1-, H727- und GOT1-Zellen nach 72 h Inkubationszeit und Konzentrationen von 5 µM, 10 µM und 20 µM AR-A014418 [1].

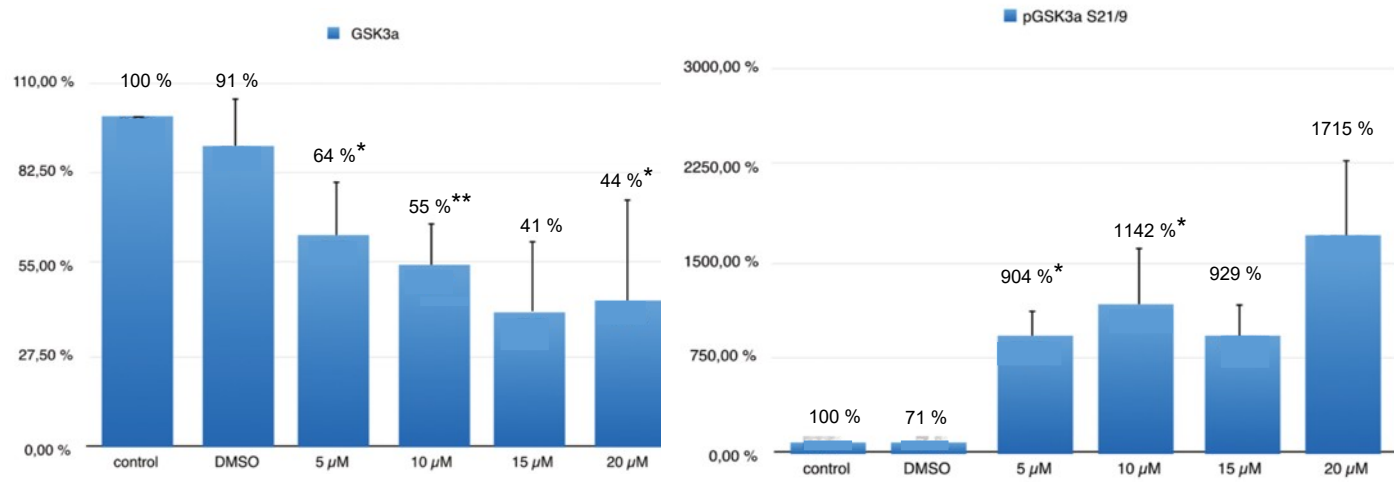
144 h	KD	AR 5 µM	AR 10 µM	AR 20 µM
BON1	100%	37%	19%	35%
QGP1	100,03%	66,43%	66,80%	504,30% *
H727	100,00%	72,97%	238,03% *	337,33% ***
GOT1	100,03%	108,83%	142,13%	258,43% **

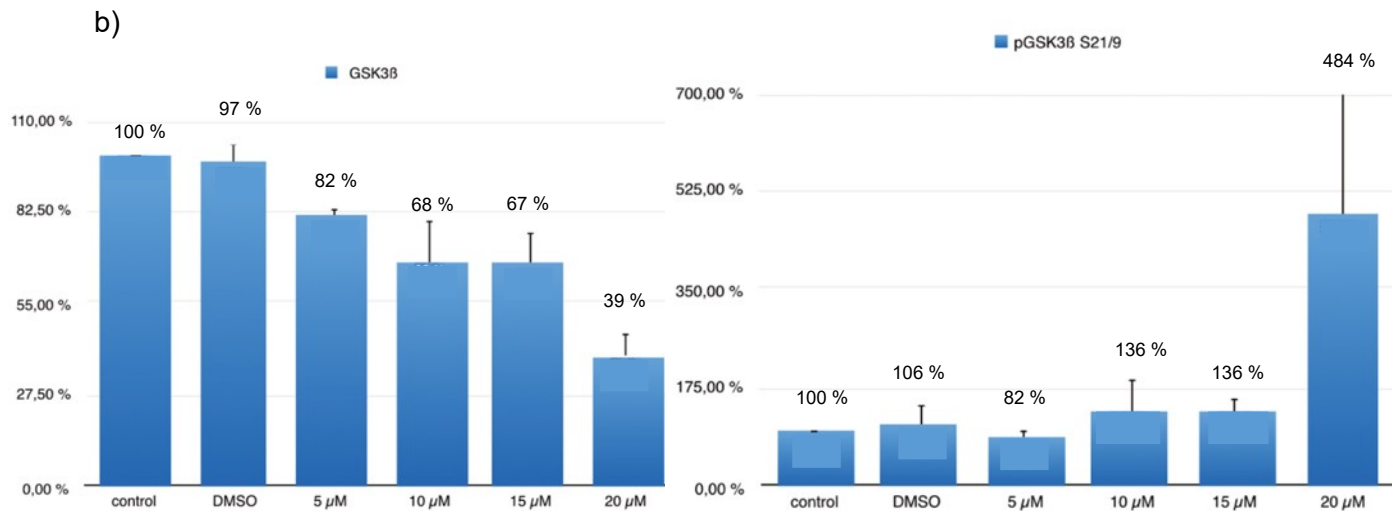
(AR = AR-A014418; KD = DMSO-Kontrolle)

Anhang Tabelle 16: *Caspase-Aktivität nach 144 h AR-A014418-Inkubation [1].* Gezeigt sind die Aktivitäten der Caspasen 3 und 9 mit Angabe der Signifikanzen in BON1-, QGP1-, H727- und GOT1-Zellen nach 144 h Inkubationszeit und Konzentrationen von 5 µM, 10 µM und 20 µM AR-A014418 [1].

Abbildungen

a)

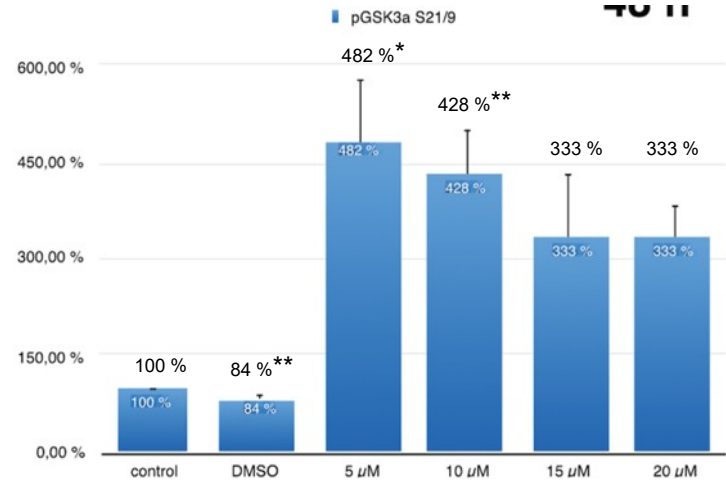
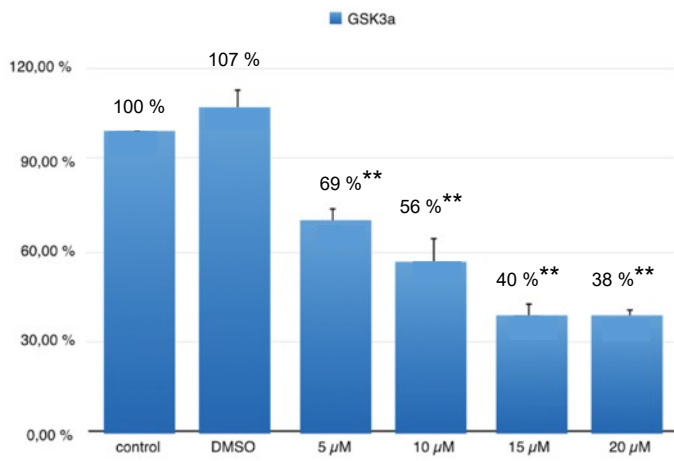




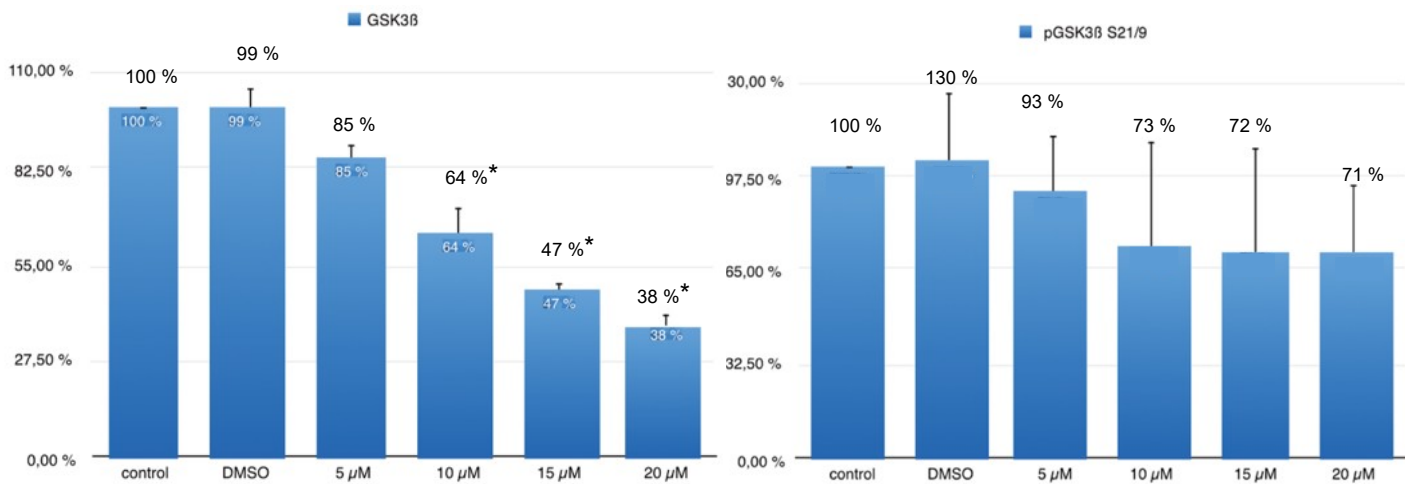
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 1: Quantifizierung der Western Blots von GSK3 α/β nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1]. Gezeigt ist die Phosphorylierung/Hemmung der GSK3 α/β in BON1-Zellen nach 48 h AR-A014418-Behandlung. a) Es zeigte sich eine volle GSK3 α -Hemmung bei allen getesteten Konzentrationen, b) eine GSK3 β -Hemmung hingegen erst ab 10 μ M mit stärkster Hemmung bei 20 μ M [1].

a)



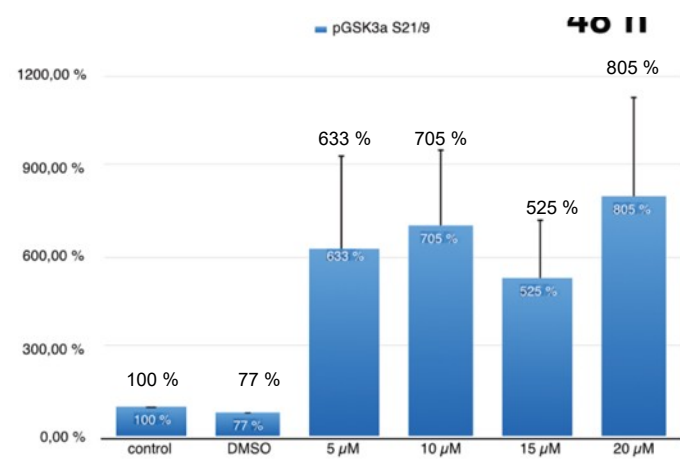
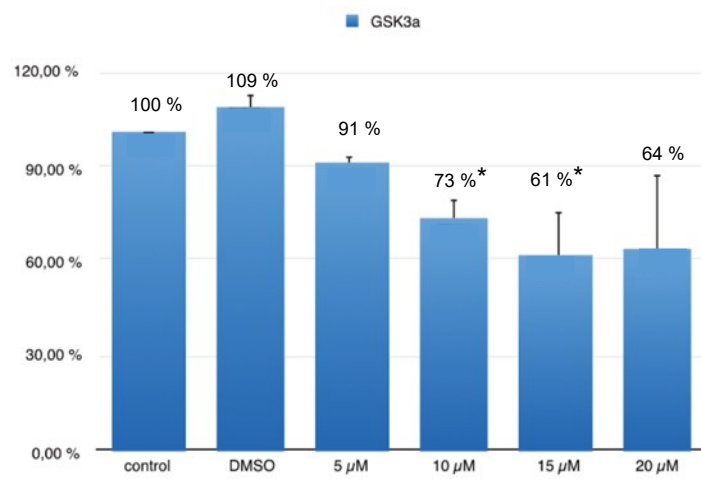
b)



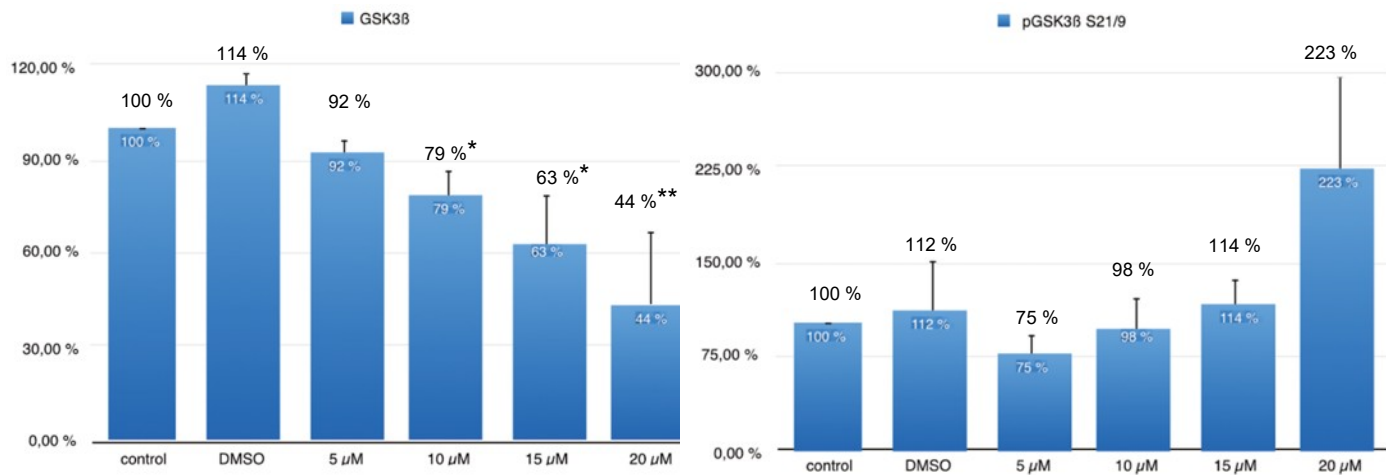
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 2: Quantifizierung der Western Blots von GSK3 α/β nach AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1]. Gezeigt ist die Phosphorylierung/Hemmung der GSK3 α/β in QGP1-Zellen nach 48 h AR-A014418-Behandlung. a) Es zeigte sich eine volle GSK3 α -Hemmung bei allen getesteten Konzentrationen, b) eine volle GSK3 β -Hemmung konnte bei keiner Konzentration gezeigt werden [1].

a)



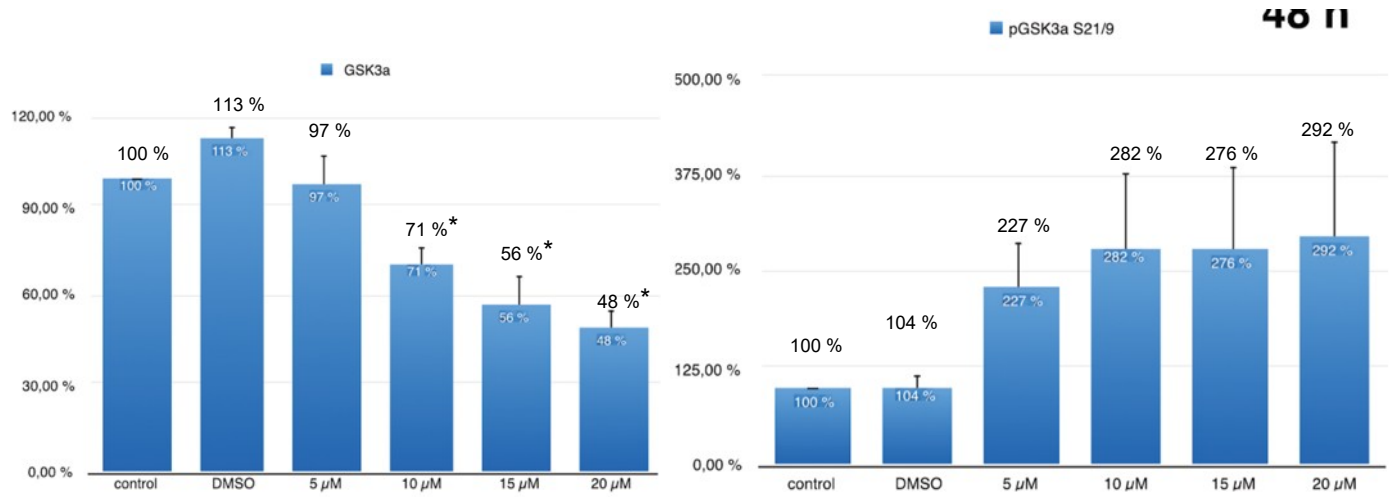
b)

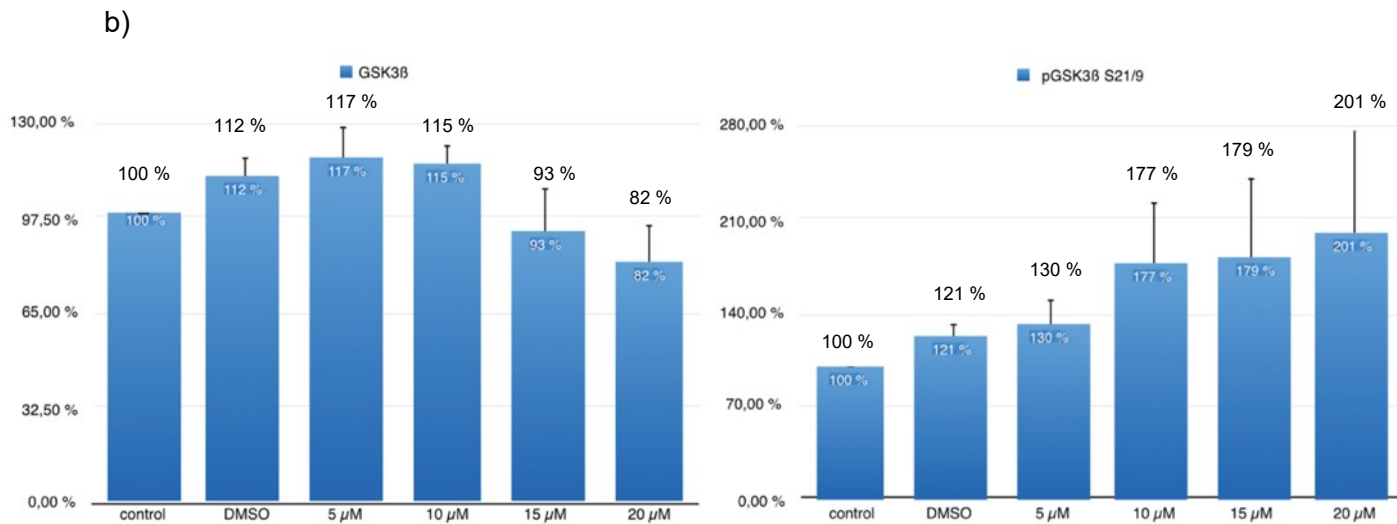


(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 3: Quantifizierung der Western Blots von GSK3 α/β nach AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1]. Gezeigt ist die Phosphorylierung/Hemmung der GSK3 α/β in H727-Zellen nach 48 h AR-A014418-Behandlung. a) Es zeigte sich eine volle GSK3 α -Hemmung bei allen getesteten Konzentrationen, b) eine GSK3 β -Hemmung hingegen nur bei 20 μ M AR-A014418 [1].

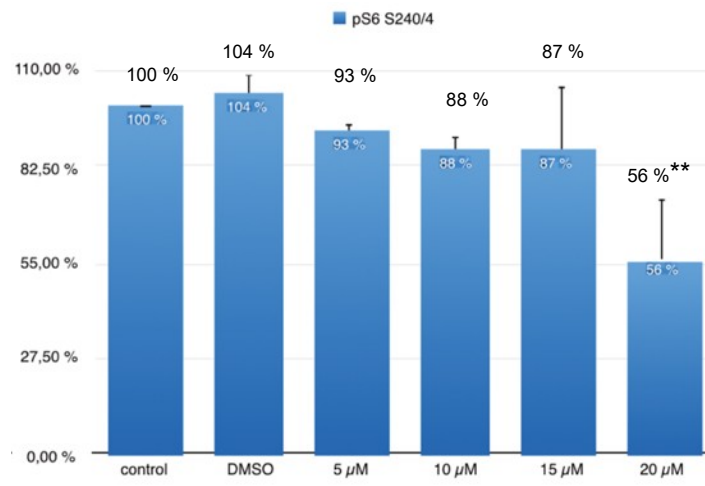
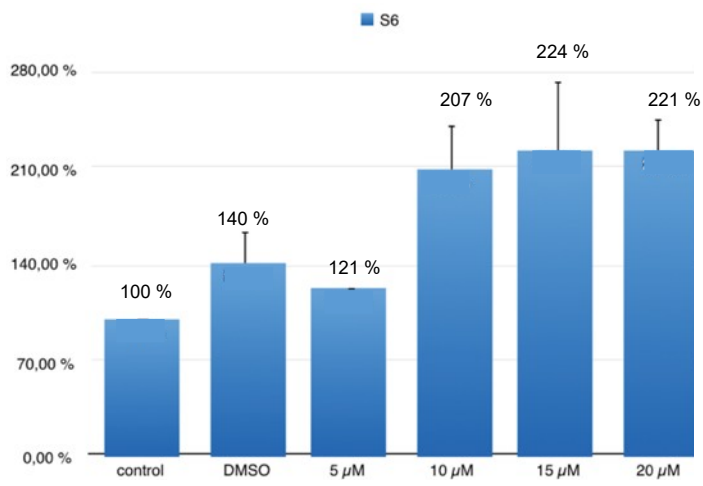
a)





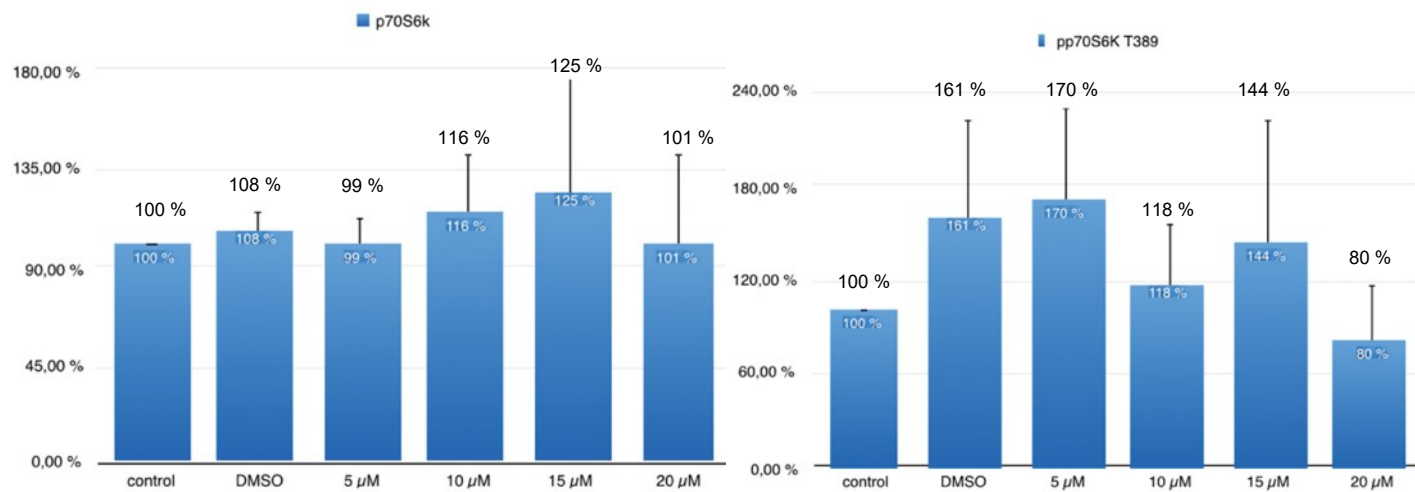
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 4: *Quantifizierung der Western Blots von GSK3 α/β nach AR-A014418-Gabe in GOT1-Zellen [1].* Gezeigt ist die Phosphorylierung/Hemmung der GSK3 α/β in GOT1-Zellen nach 48 h AR-A014418-Behandlung. a) Es zeigte sich eine volle GSK3 α -Hemmung bei allen getesteten Konzentrationen, b) eine GSK3 β -Hemmung hingegen erst ab 10 μ M AR-A014418 [1].



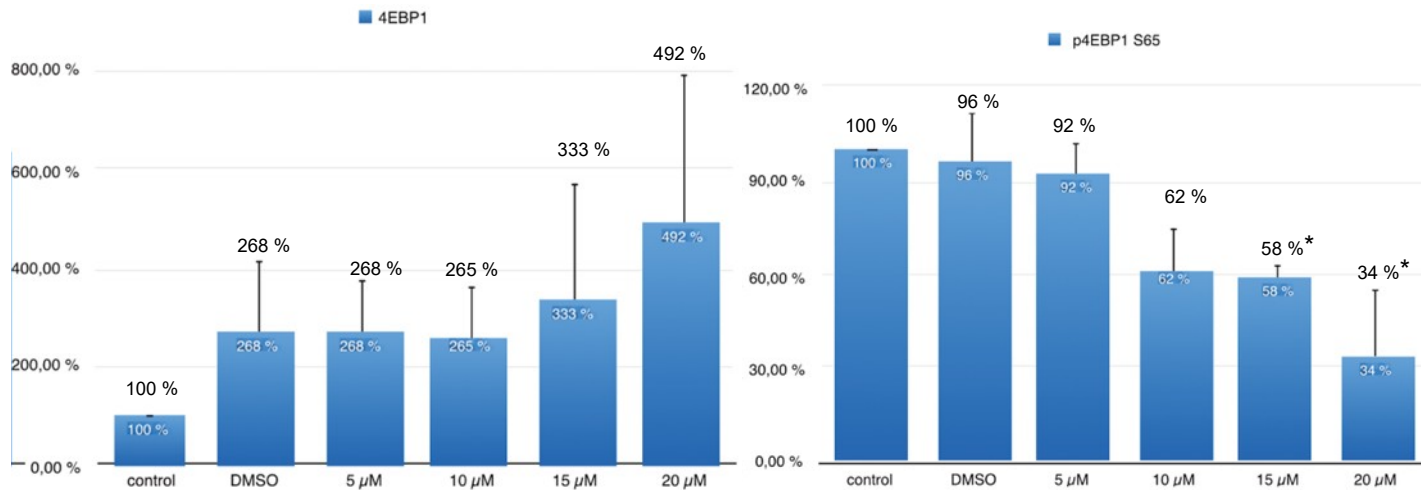
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 5: *Quantifizierung der Western Blots von S6 nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1].* Gezeigt ist die Dephosphorylierung/Hemmung von S6 in BON1-Zellen nach 48 h AR-A014418-Behandlung. Es zeigte sich eine sehr deutliche Hemmung ab einer Konzentration von 20 μ M [1].



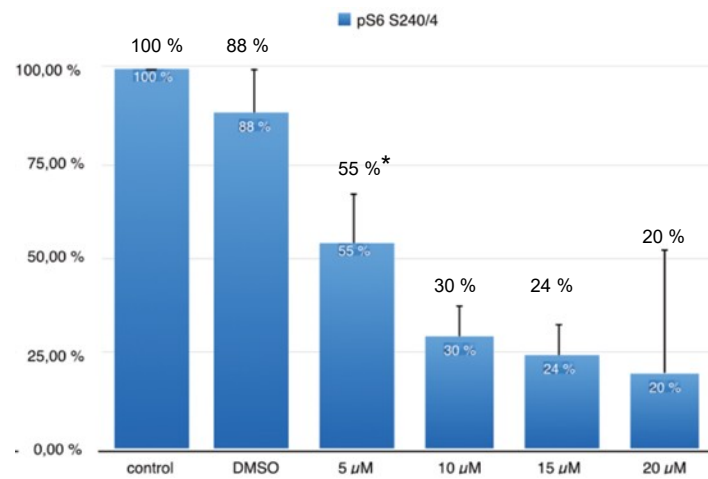
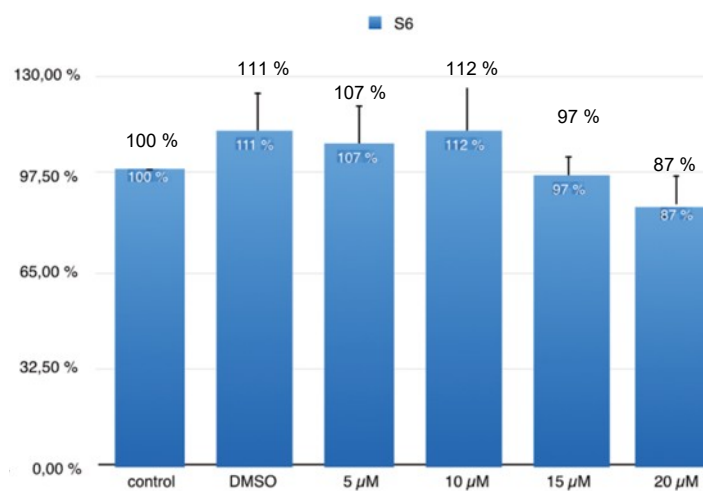
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 6: *Quantifizierung der Western Blots von p70S6K nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1].* Gezeigt ist die Dephosphorylierung/Hemmung von p70S6K in BON1-Zellen nach 48 h AR-A014418-Behandlung. Es zeigte sich eine deutliche Hemmung ab einer Konzentration von 10 µM [1].



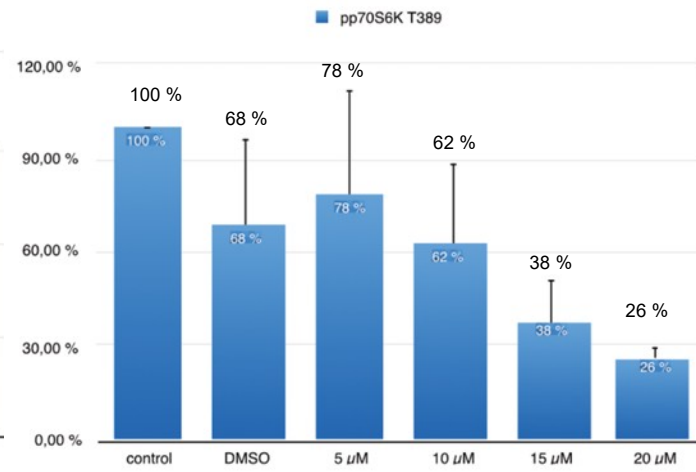
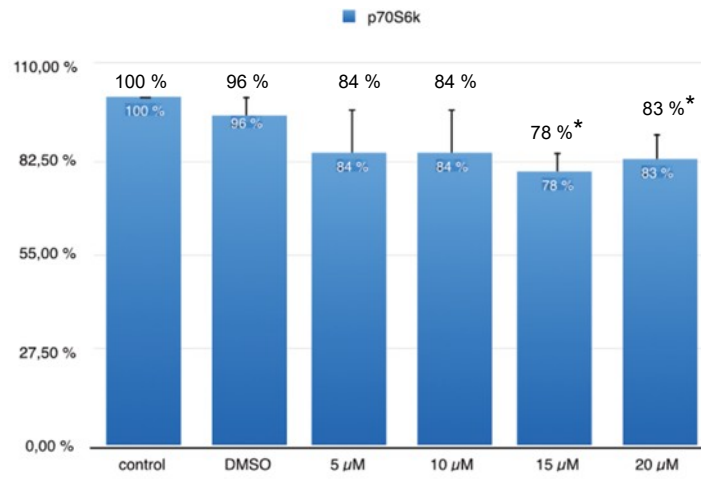
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 7: Quantifizierung der Western Blots von 4EBP1 nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1]. Gezeigt ist die Dephosphorylierung/Hemmung von 4EBP1 in BON1-Zellen nach 48 h AR-A014418-Behandlung. Es zeigte sich eine deutliche Hemmung ab einer Konzentration von 10 μ M [1].



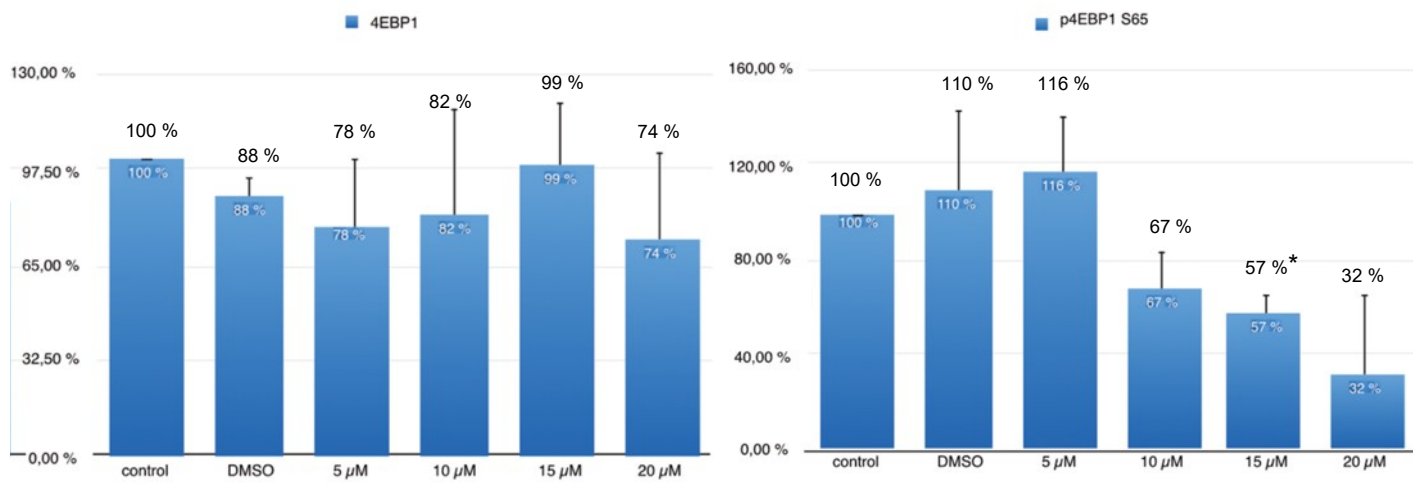
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 8: *Quantifizierung der Western Blots von S6 nach AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1].* Gezeigt ist die Dephosphorylierung/Hemmung von S6 in QGP1-Zellen nach 48 h AR-A014418-Behandlung. Es zeigte sich eine deutliche Hemmung bereits ab einer Konzentration von 5 μ M [1].



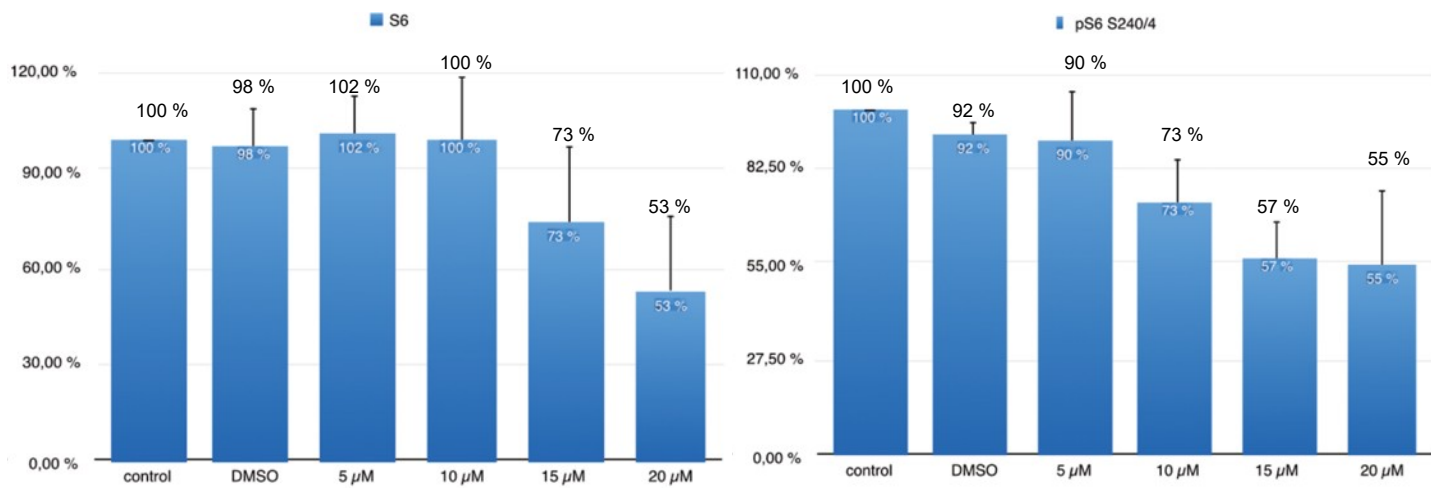
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 9: *Quantifizierung der Western Blots von p70S6K nach AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1].* Gezeigt ist die Dephosphorylierung/Hemmung von p70S6K in QGP1-Zellen nach 48 h AR-A014418-Behandlung. Es zeigte sich eine deutliche Hemmung ab einer Konzentration von 15 μ M [1].



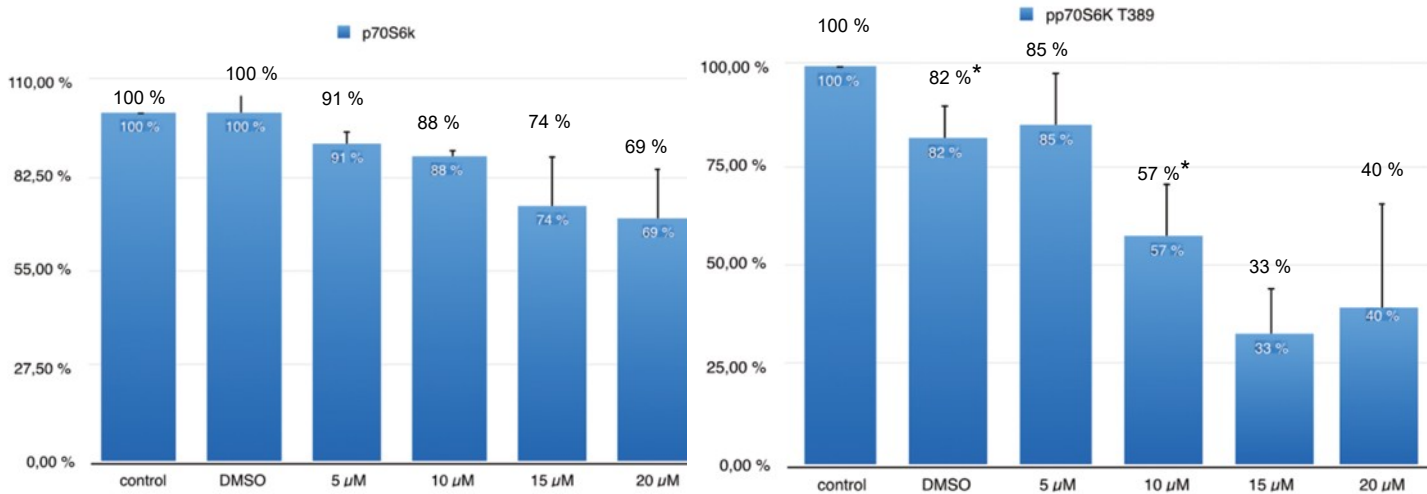
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 10: *Quantifizierung der Western Blots von 4EBP1 nach AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1].* Gezeigt ist die Dephosphorylierung/Hemmung von 4EBP1 in QGP1-Zellen nach 48 h AR-A014418-Behandlung. Es zeigte sich eine deutliche Hemmung ab einer Konzentration von 10 μ M [1].



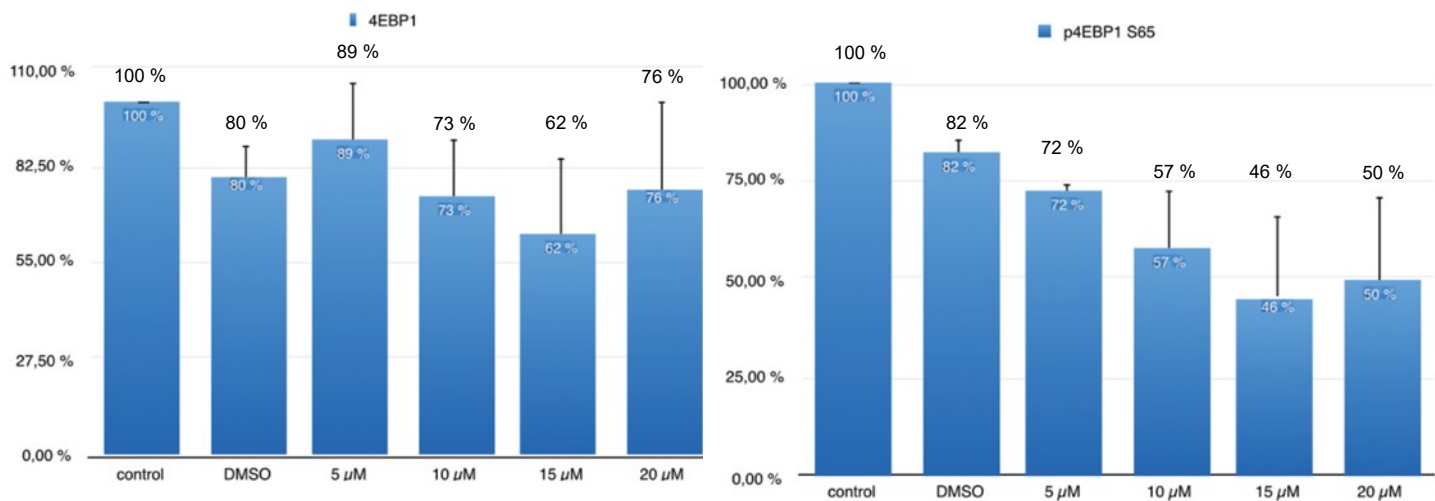
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 11: *Quantifizierung der Western Blots von S6 nach AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1].* Gezeigt ist die Dephosphorylierung/Hemmung von S6 in H727-Zellen nach 48 h AR-A014418-Behandlung. Es zeigte sich eine Hemmung bereits ab einer Konzentration von 10 μM [1].



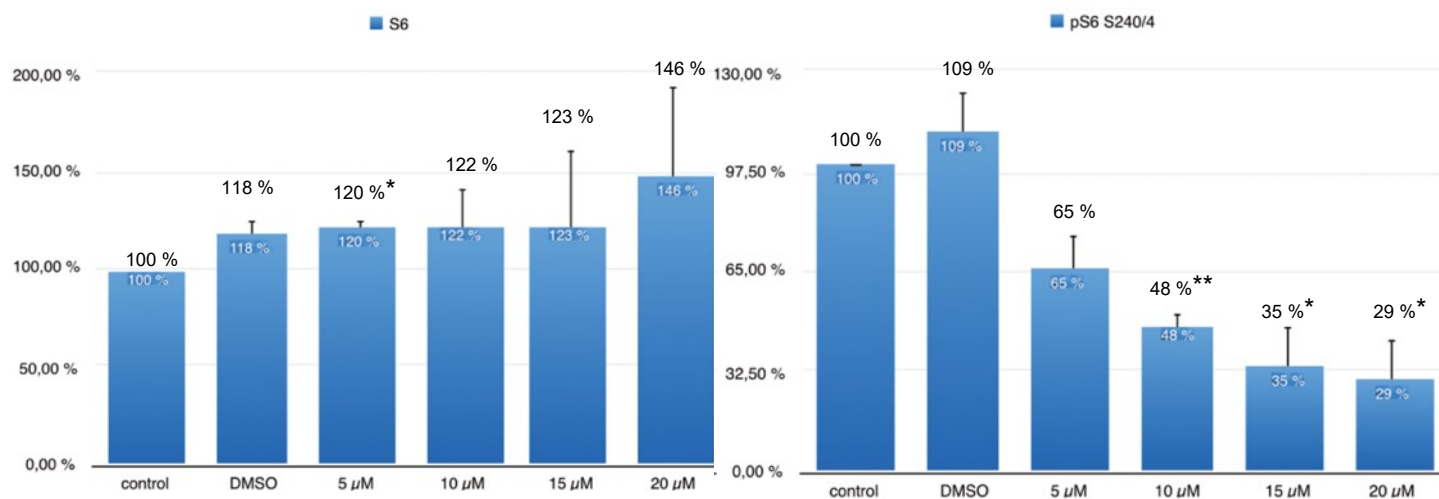
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 12: Quantifizierung der Western Blots von p70S6K nach AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1]. Gezeigt ist die Dephosphorylierung/Hemmung von p70S6K in H727-Zellen nach 48 h AR-A014418-Behandlung. Es zeigte sich eine Hemmung ab einer Konzentration von 10 µM [1].



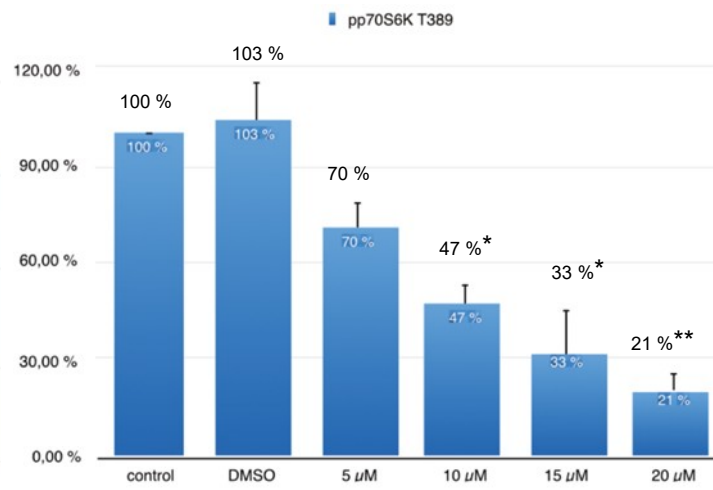
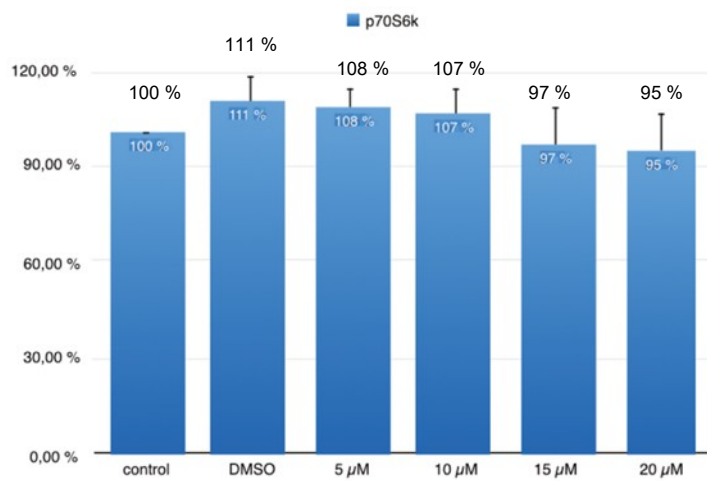
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 13: Quantifizierung der Western Blots von 4EBP1 nach AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1]. Gezeigt ist die Dephosphorylierung/Hemmung von 4EBP1 in H727-Zellen nach 48 h AR-A014418-Behandlung. Es zeigte sich eine deutliche Hemmung ab einer Konzentration von 10 μ M [1].



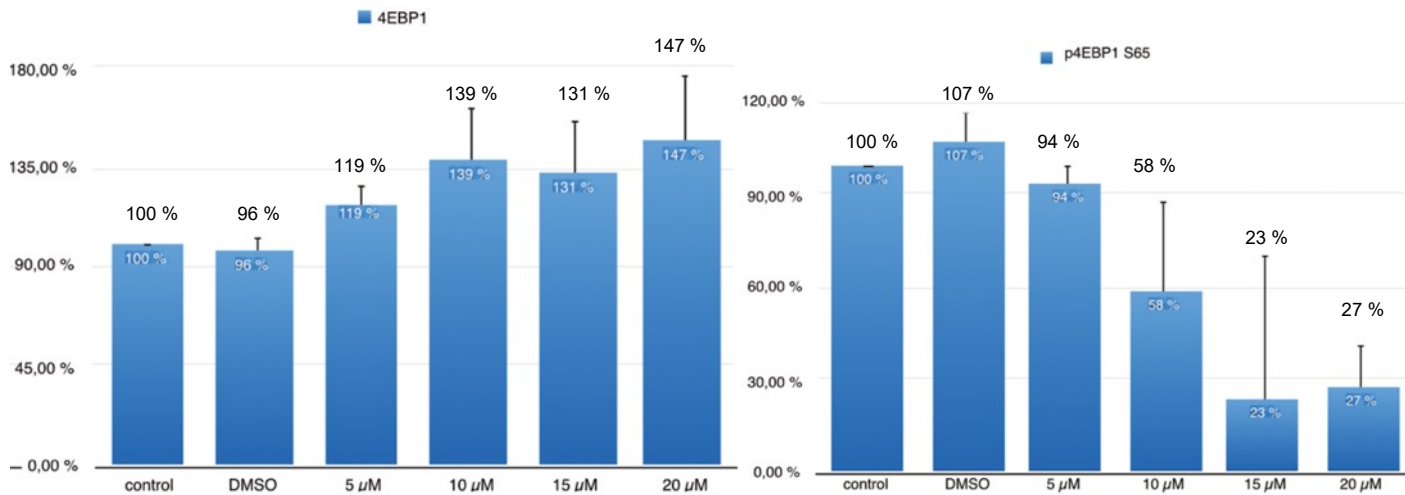
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 14: *Quantifizierung der Western Blots von S6 nach AR-A014418-Gabe in GOT1-Zellen [1].* Gezeigt ist die Dephosphorylierung/Hemmung von S6 in GOT1-Zellen nach 48 h AR-A014418-Behandlung. Es zeigte sich eine Hemmung bereits ab einer Konzentration von 5 μ M [1].



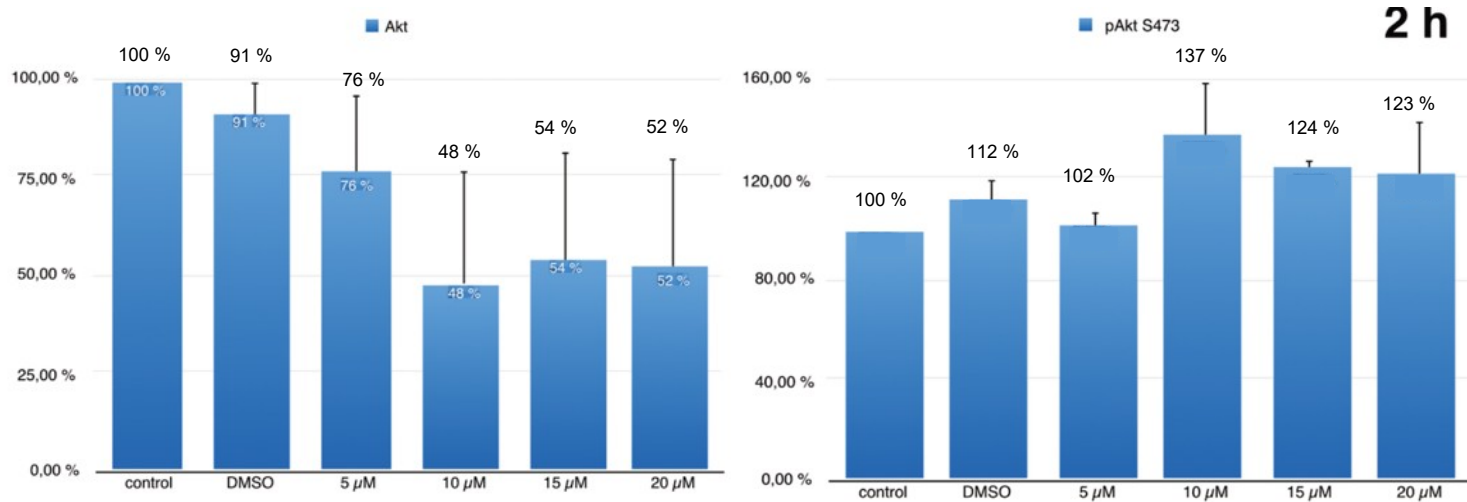
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 15: Quantifizierung der Western Blots von p70S6K nach AR-A014418-Gabe in GOT1-Zellen [1]. Gezeigt ist die Dephosphorylierung/Hemmung von p70S6K in GOT1-Zellen nach 48 h AR-A014418-Behandlung. Es zeigte sich eine Hemmung ab einer Konzentration von 5 μ M [1].



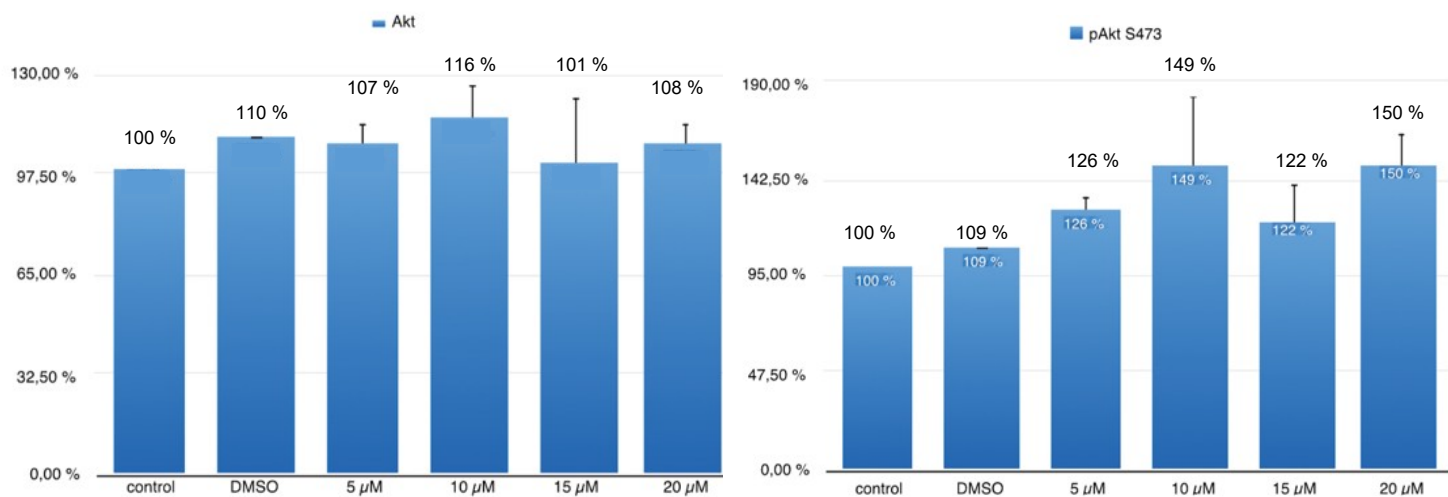
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 16: *Quantifizierung der Western Blots von 4EBP1 nach AR-A014418-Gabe in GOT1-Zellen [1].* Gezeigt ist die Dephosphorylierung/Hemmung von 4EBP1 in GOT1-Zellen nach 48 h AR-A014418-Behandlung. Es zeigte sich eine deutliche Hemmung ab einer Konzentration von 10 μ M [1].



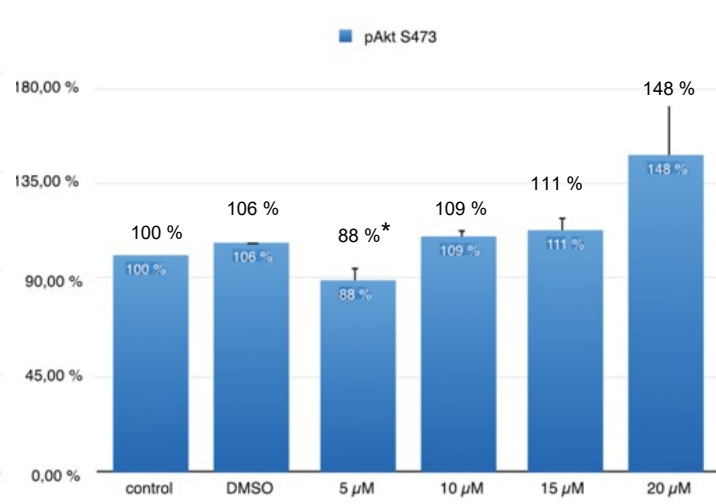
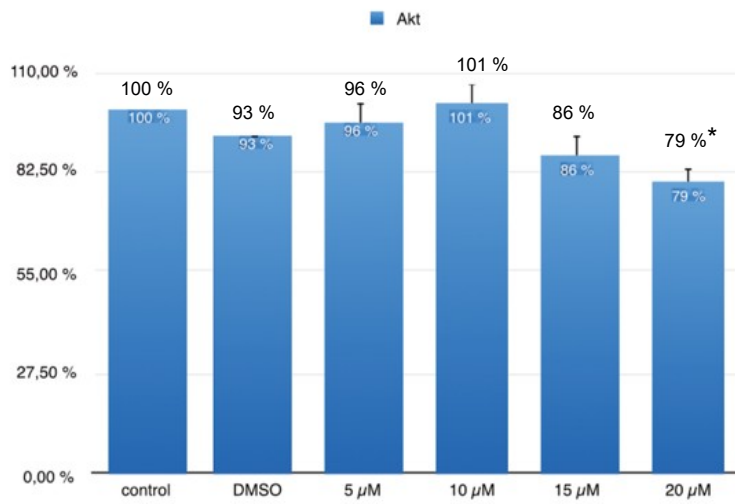
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 17: Quantifizierung der Western Blots von Akt nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1]. Eine Aktivierung von Akt konnte in BON1-Zellen nach 2 h ab einer AR-A014418-Konzentration von 10 µM beobachtet werden [1].



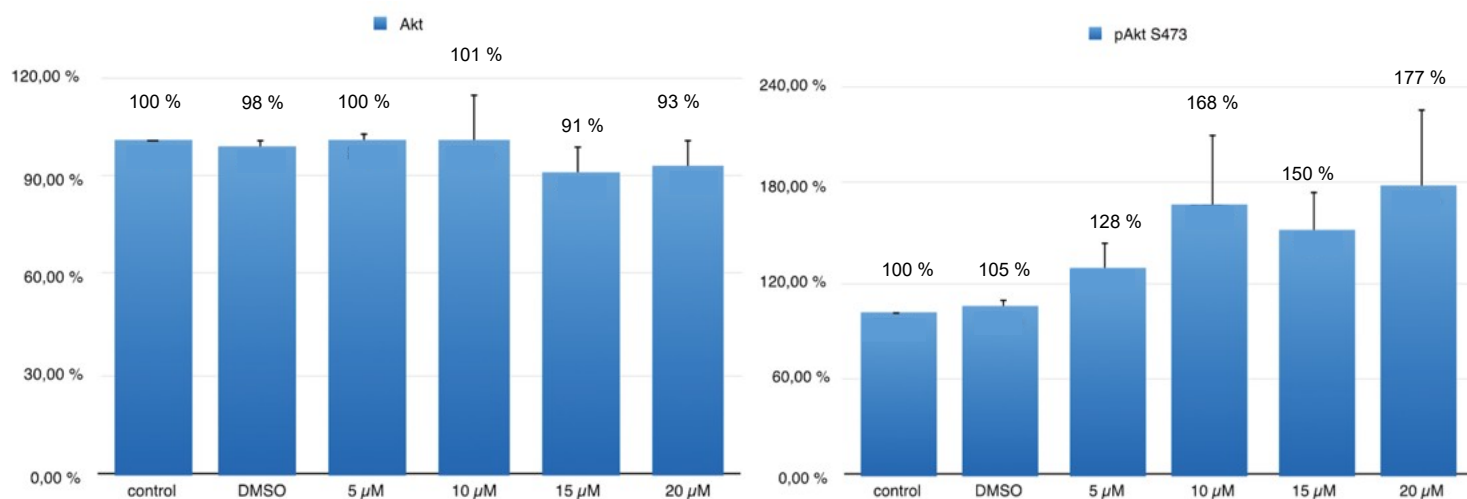
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 18: *Quantifizierung der Western Blots von Akt nach AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1].* Eine Aktivierung von Akt konnte in QGP1-Zellen nach 2 h ab einer AR-A014418-Konzentration von 5 µM beobachtet werden [1].



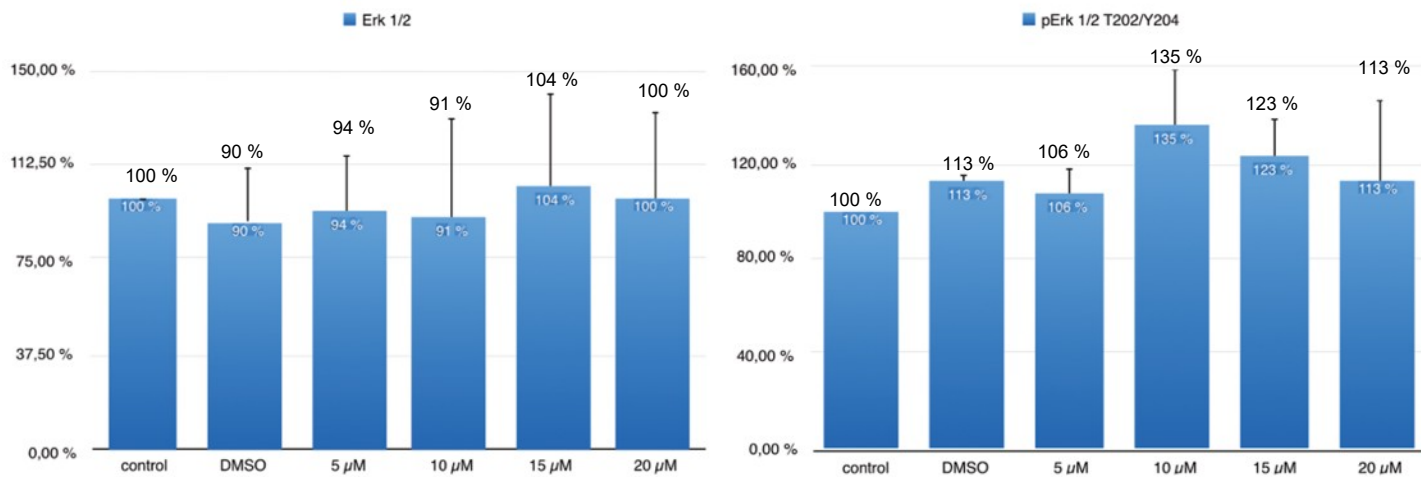
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 19: *Quantifizierung der Western Blots von Akt nach AR-A014418-Gabe in H727-Zelle [1].* Eine Aktivierung von Akt konnte in H727-Zellen nach 2 h nur bei einer AR-A014418-Konzentration von 20 μM beobachtet werden [1].



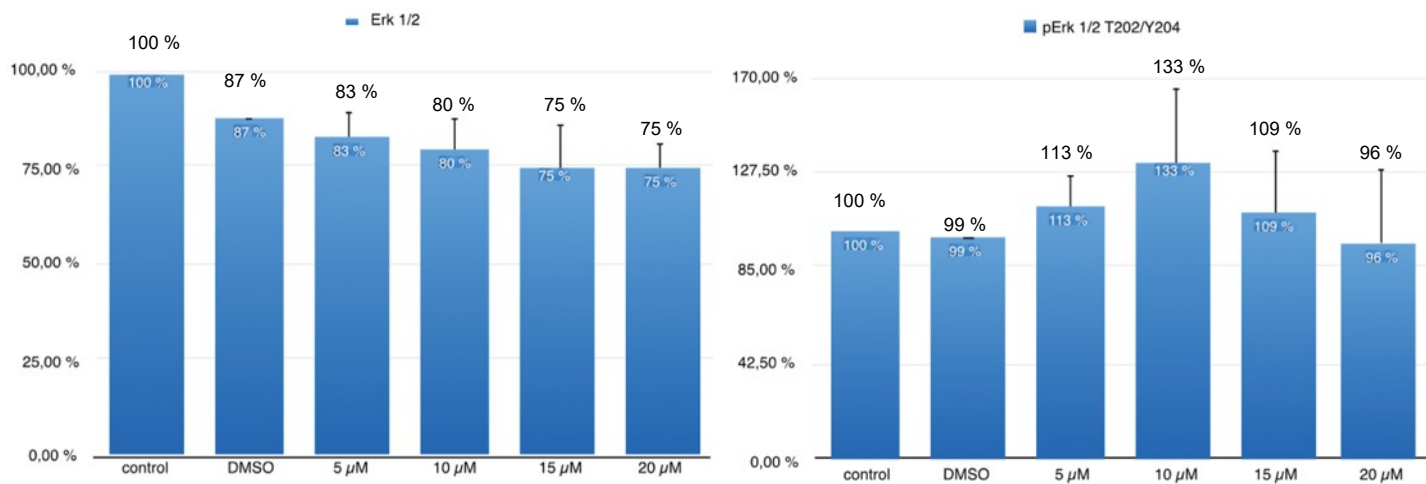
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 20: *Quantifizierung der Western Blots von Akt nach AR-A014418-Gabe in GOT1-Zellen [1].* Eine Aktivierung von Akt konnte in GOT1-Zellen nach 2 h bereits ab einer AR-A014418-Konzentration von 5 μ M beobachtet werden [1].



(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

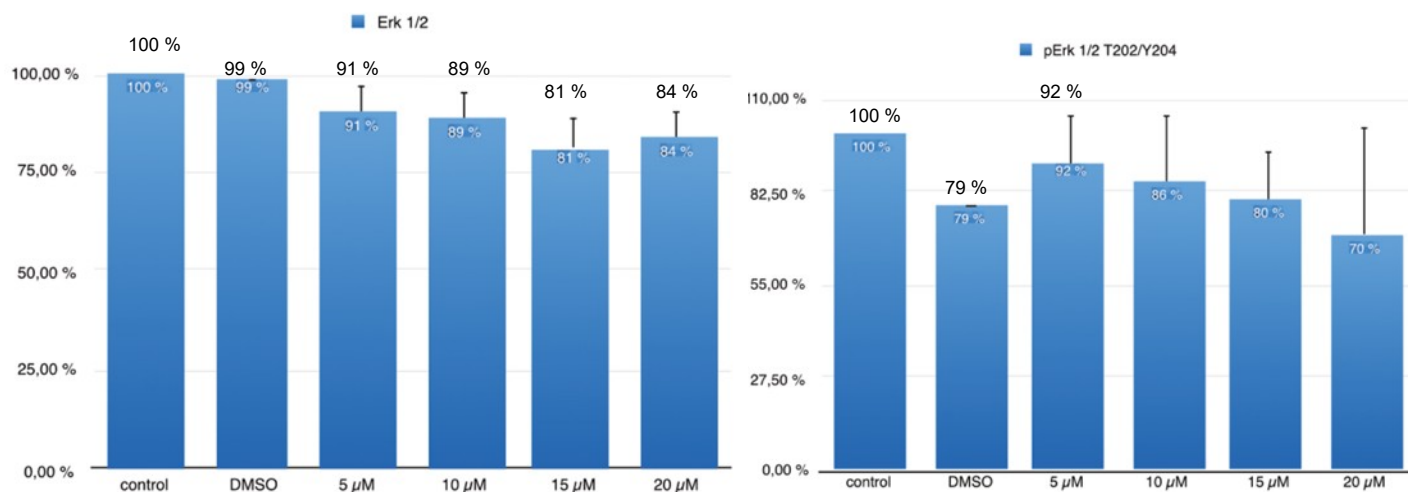
Anhang Abbildung 21: Quantifizierung der Western Blots von ERK nach AR-A014418-Kurzinkubation in BON1-Zellen [1]. Eine Aktivierung von ERK konnte in BON1-Zellen nach 2 h v.a. bei einer AR-A014418-Konzentration von 10 µM gezeigt werden [1].



(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

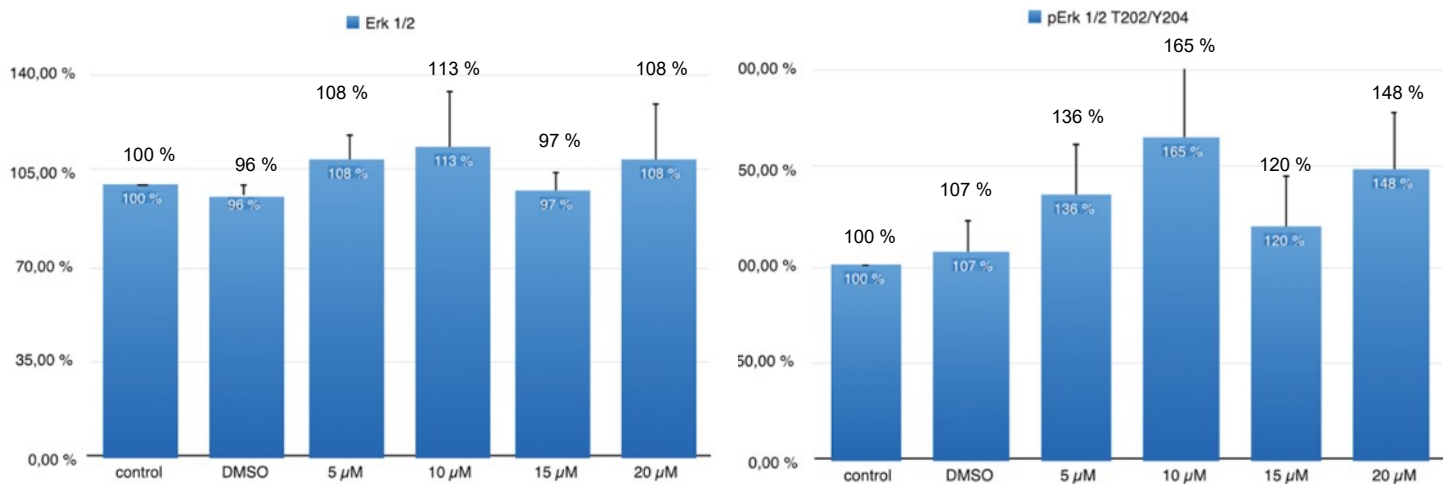
Anhang Abbildung 22: Quantifizierung der Western Blots von ERK nach AR-A014418-Kurzinkubation in QGP1-Zellen. Eine Aktivierung von ERK konnte in QGP1-Zellen nach 2 h v.a. bei den niedrigen AR-A014418-Konzentrationsbereichen von 5 μM und 10 μM beobachtet werden.

86 %
80 %
70 %



(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

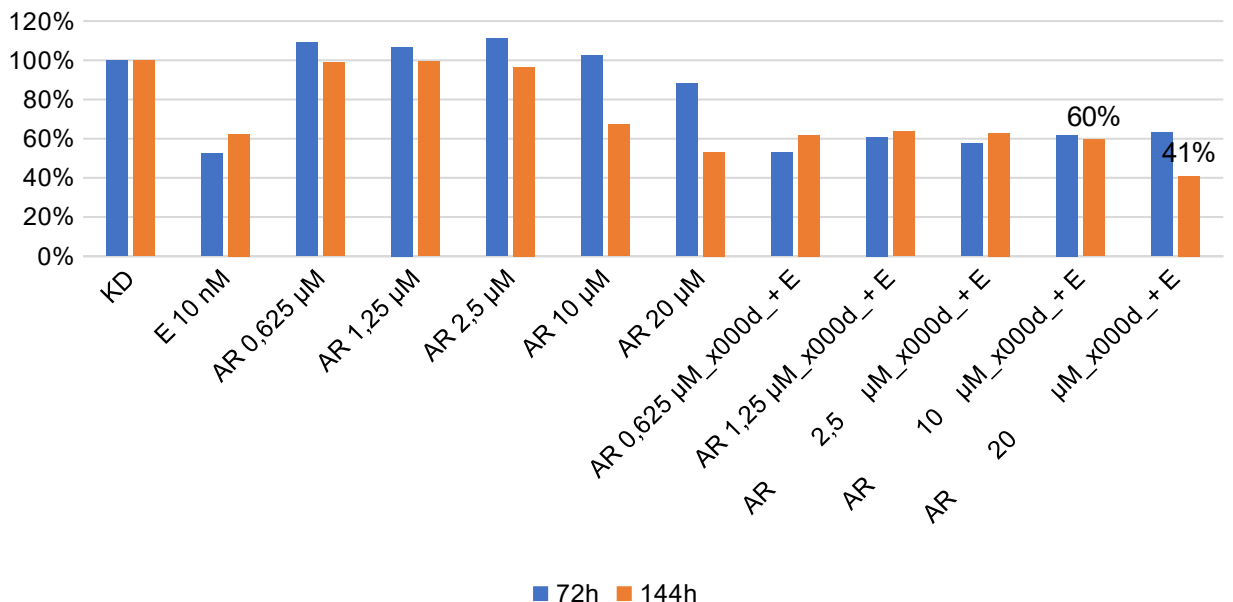
Anhang Abbildung 23: *Quantifizierung der Western Blots von ERK nach AR-A014418-Kurzinkubation in H727-Zellen [1].* Eine Aktivierung von ERK konnte in H727-Zellen nach 2 h bei keiner der getesteten AR-A014418-Konzentrationen beobachtet werden [1].



(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

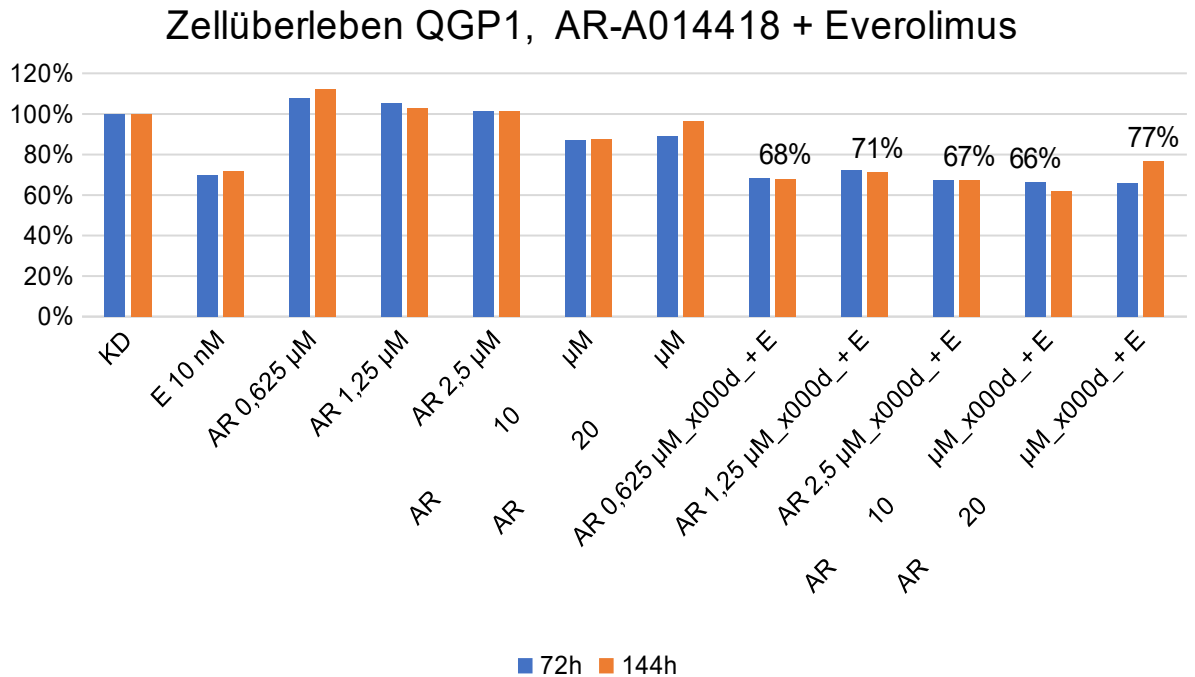
Anhang Abbildung 24: Quantifizierung der Western Blots von ERK nach AR-A014418-Kurzinkubation in GOT1-Zellen [1]. Eine Aktivierung von ERK konnte in GOT1-Zellen nach 2 h bereits ab einer AR-A014418-Konzentration von 5 µM beobachtet werden [1].

Zellüberleben BON1, AR-A014418 + Everolimus



(AR = AR-A014418; E = Everolimus 10 nM; KD = DMSO-Kontrolle; ant = antagonistisch; „+“ = p< 0,05)

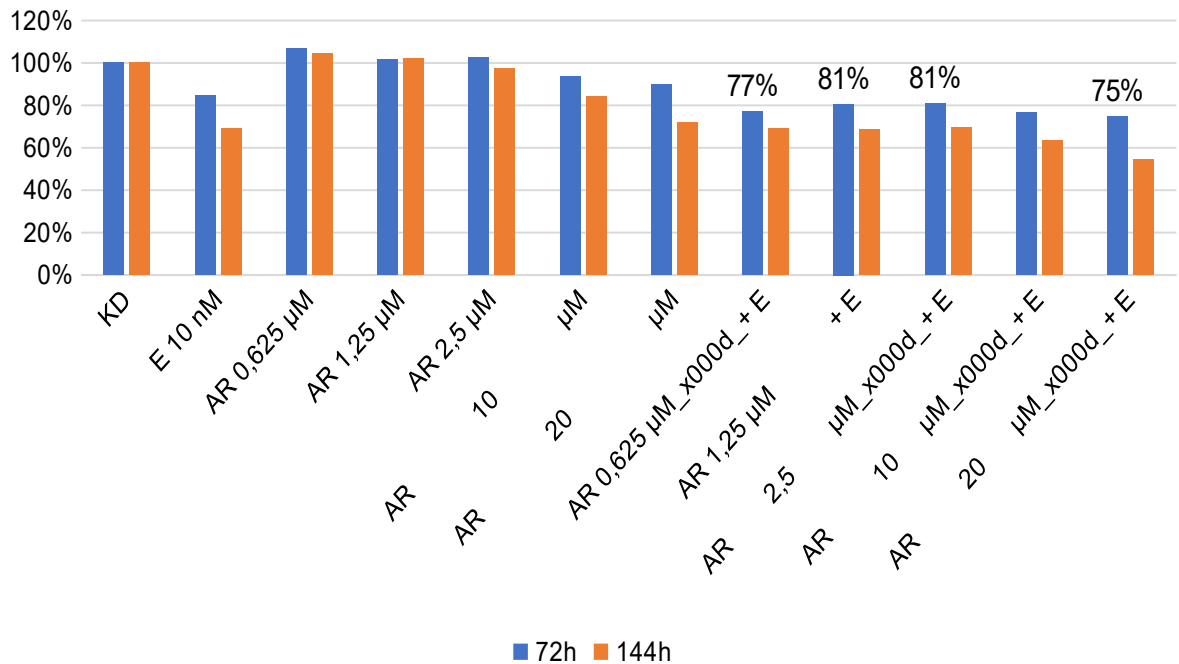
Anhang Abbildung 25: Zellüberleben nach AR-A014418- und Everolimus-Gabe in BON1-Zellen [1]. In BON1-Zellen zeigte sich bei höheren Kombinationskonzentrationen von AR-A014418 plus Everolimus (10 μ M und 20 μ M AR-A014418 plus 10 nM Everolimus) ein statistisch signifikanter antagonistischer Effekt [1].



(AR = AR-A014418; E = Everolimus 10 nM; KD = DMOS-Kontrolle;
syn = synergistisch; add = additiv; ant = antagonistisch; „+“ = $p < 0,05$)

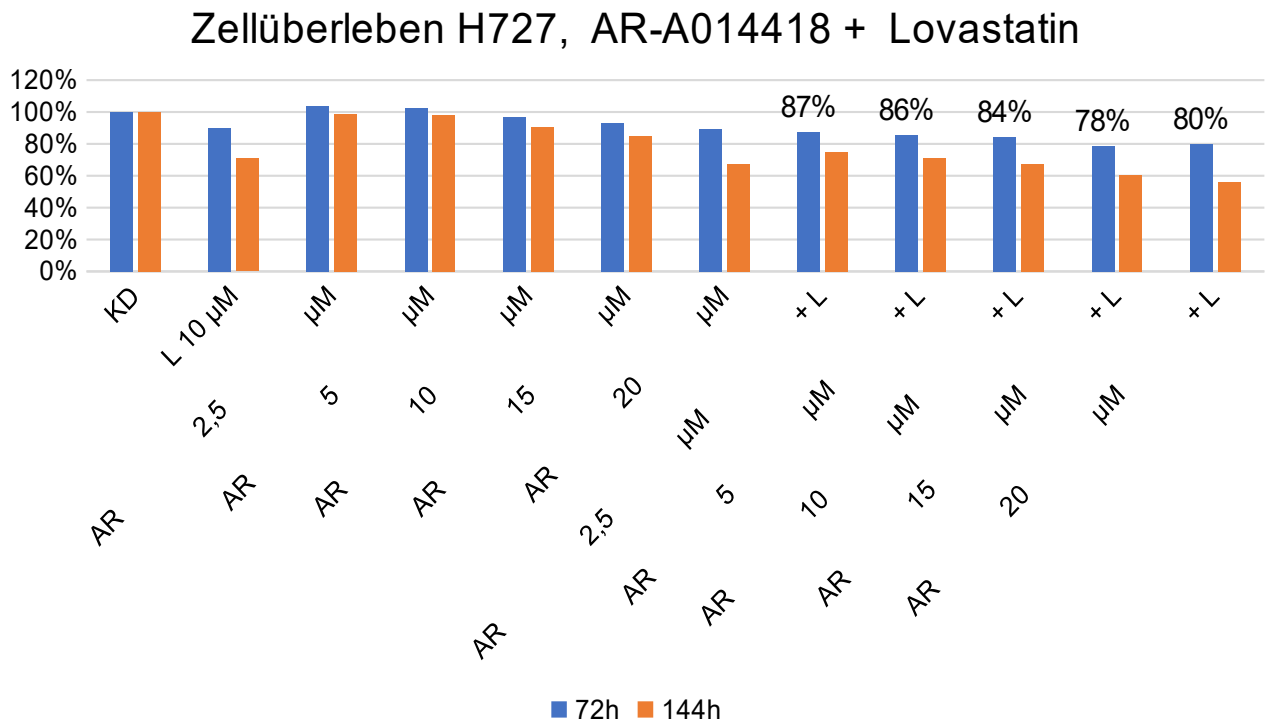
Anhang Abbildung 26: Zellüberleben nach AR-A014418- und Everolimus-Gabe in QGP1-Zellen [1]. In QGP1-Zellen zeigte sich bei der niedrigsten Kombinationskonzentration von 0,625 µM AR-A014418 plus 10 nM Everolimus ein statistisch signifikanter synergistischer Effekt, bei mittleren Kombinationskonzentrationen (1,25 µM und 2,5 µM AR-A014418 plus 10 nM Everolimus) ein statistisch signifikanter additiver Effekt und bei höheren Kombinationskonzentrationen ein statistisch signifikanter antagonistischer Effekt (10 µM und 20 µM AR-A014418 plus 10 nM Everolimus) [1].

Zellüberleben H727, AR-A014418 + Everolimus



(AR = AR-A014418; E = Everolimus 10 nM; KD = DMOS-Kontrolle;
syn = synergistisch; add = additiv; ant = antagonistisch; „+“ = $p < 0,05$)

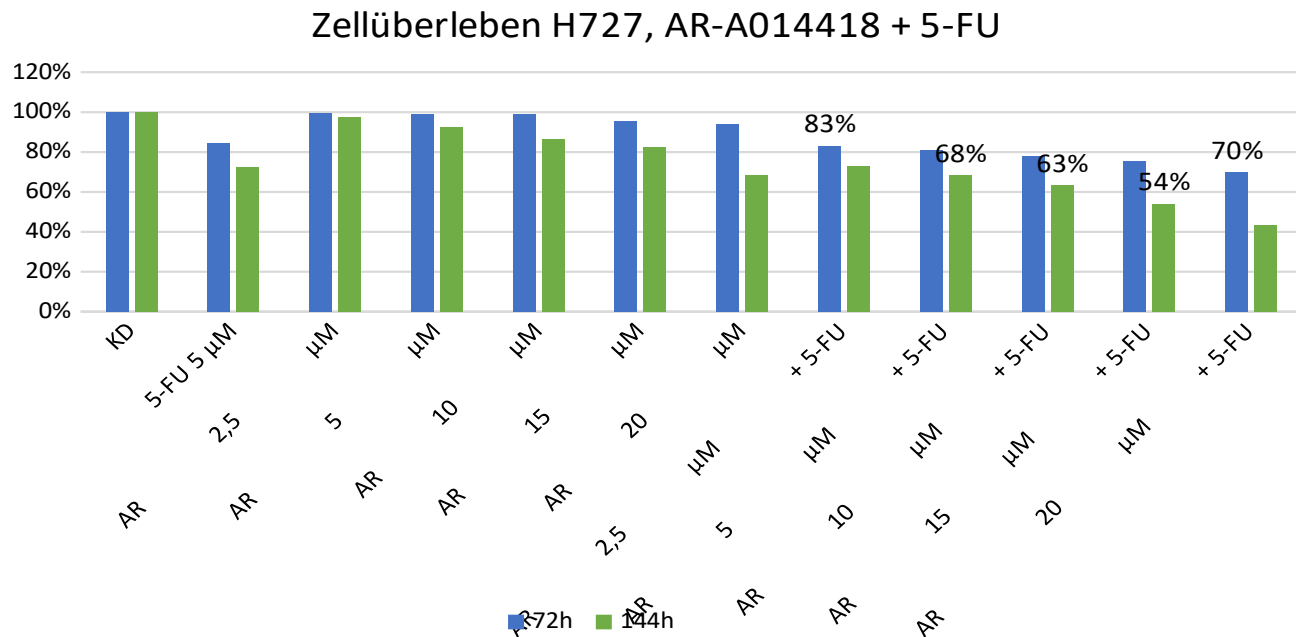
Anhang Abbildung 27: Zellüberleben nach AR-A014418- und Everolimus-Gabe in H727-Zellen [1]. In H727-Zellen zeigte sich bei niedriger Kombinationskonzentration von 0,625 µM AR-A014418 plus 10 nM Everolimus ein statistisch signifikanter synergistischer Effekt, bei mittleren Kombinationskonzentrationen (1,25 µM und 2,5 µM AR-A014418 plus 10 nM Everolimus) ein statistisch signifikanter additiver Effekt und bei hoher Kombinationskonzentration (20 µM AR-A014418 plus 10 nM Everolimus) ein statistisch signifikanter antagonistischer Effekt [1].



(AR = AR-A014418; L = Lovastatin 10 μM; KD = DMSO-Kontrolle;
add = additiv)

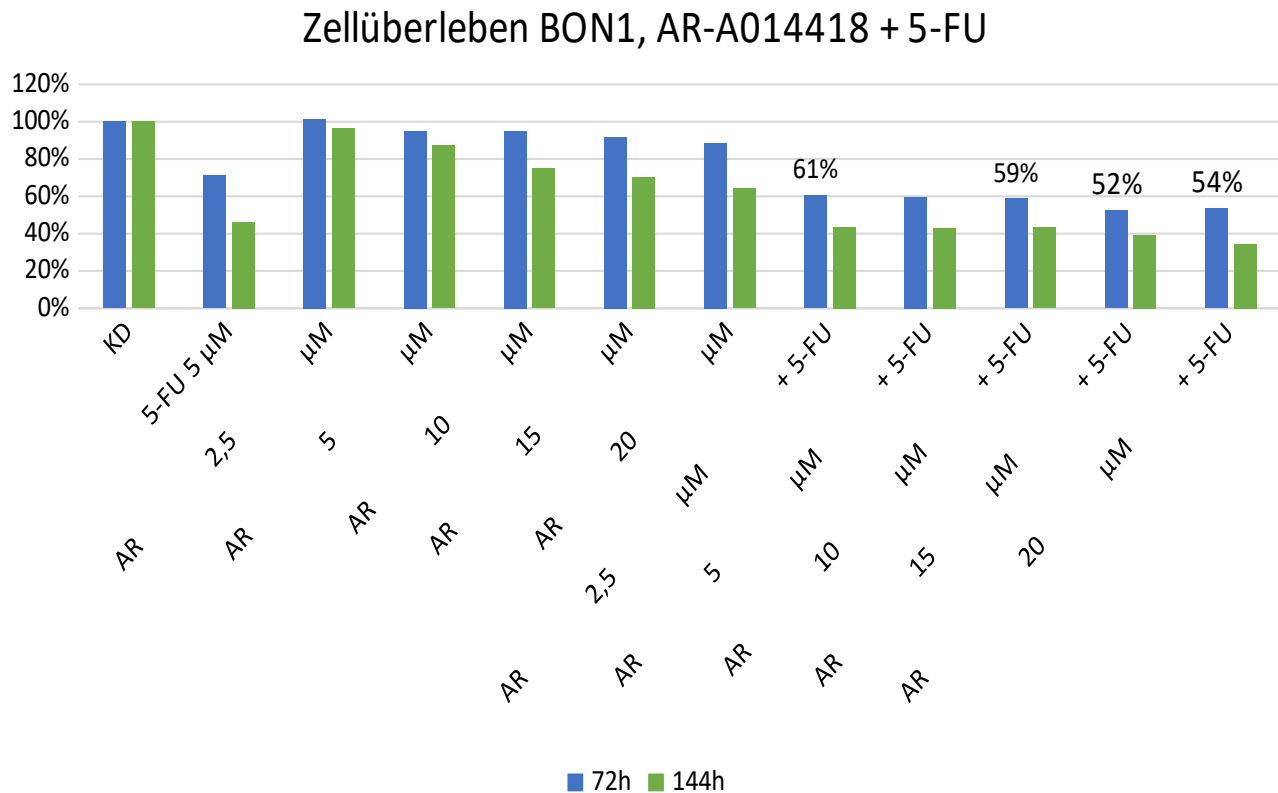
Anhang Abbildung 28: Zellüberleben nach AR-A014418- und Lovastatin-Gabe in H727-Zellen [1]. In H727-Zellen zeigte sich ein statistisch signifikanter additiver Effekt bei allen Kombinationsgaben von 2,5 μM – 20 μM

AR-A014418 plus 10 μM Lovastatin [1].



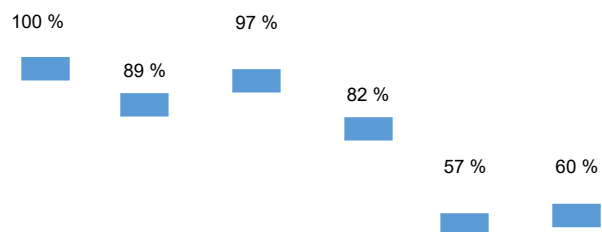
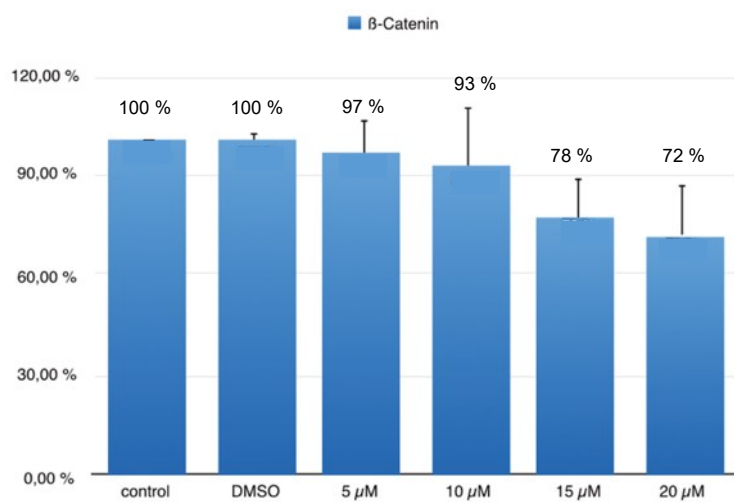
(AR = AR-A014418; KD = DMSO-Kontrolle; 5-FU = 5-FU 5 μM;
add = additiv)

Anhang Abbildung 29: Zellüberleben nach AR-A014418- und 5-FU-Gabe in H727-Zellen [1]. In H727-Zellen zeigte sich ein statistisch signifikanter additiver Effekt bei allen getesteten Kombinationsgaben von AR-A014418 plus 5-FU (2,5 μM – 20 μM AR-A014418 plus 5 μM 5-FU) außer bei 10 μM AR-A014418 plus 5 μM 5-FU [1].



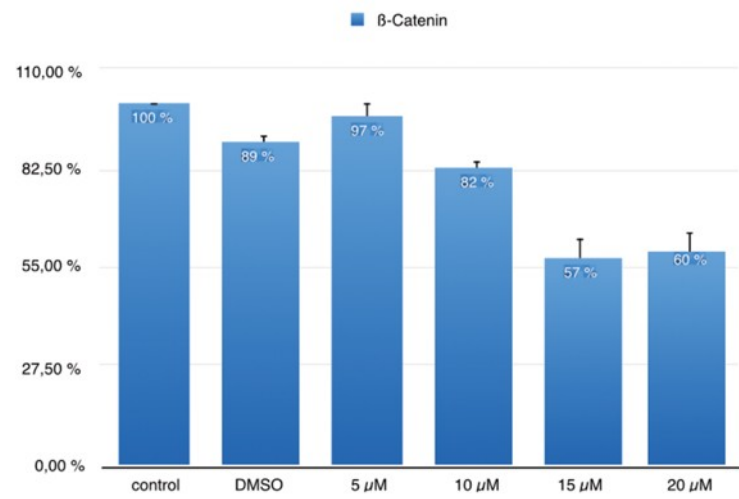
(AR = AR-A014418; KD = DMOS-Kontrolle; 5-FU = 5-FU 5 µM;
syn = synergistisch; add = additiv; ant = antagonistisch; „+“ = $p < 0,05$)

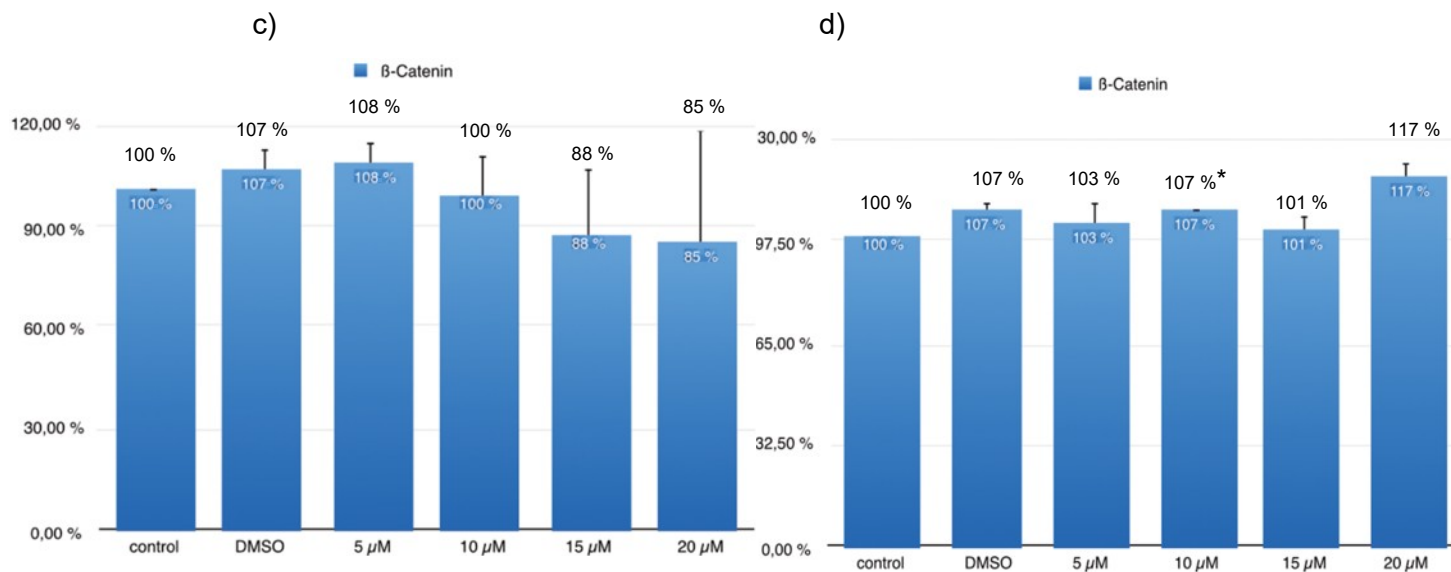
Anhang Abbildung 30: Zellüberleben nach AR-A014418- und 5-FU-Gabe in BON1-Zellen [1]. In BON1-Zellen zeigte sich ein statistisch signifikanter additiver Effekt bei der geringsten Konzentration der Kombinationsgabe von 2,5 µM AR-A014418 plus 5 µM 5-FU, die höheren Kombinationsgaben zeigten antagonistische Effekte ab 10 µM AR-A014418 plus 5 µM 5-FU. [1]



a)

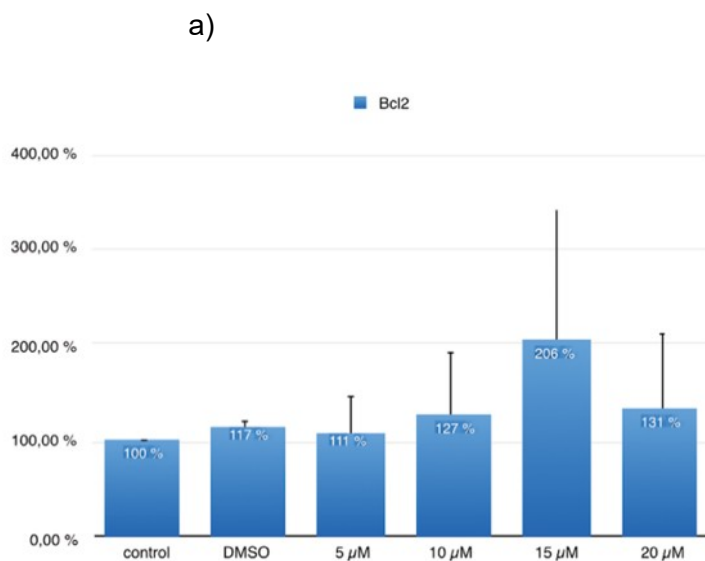
b)

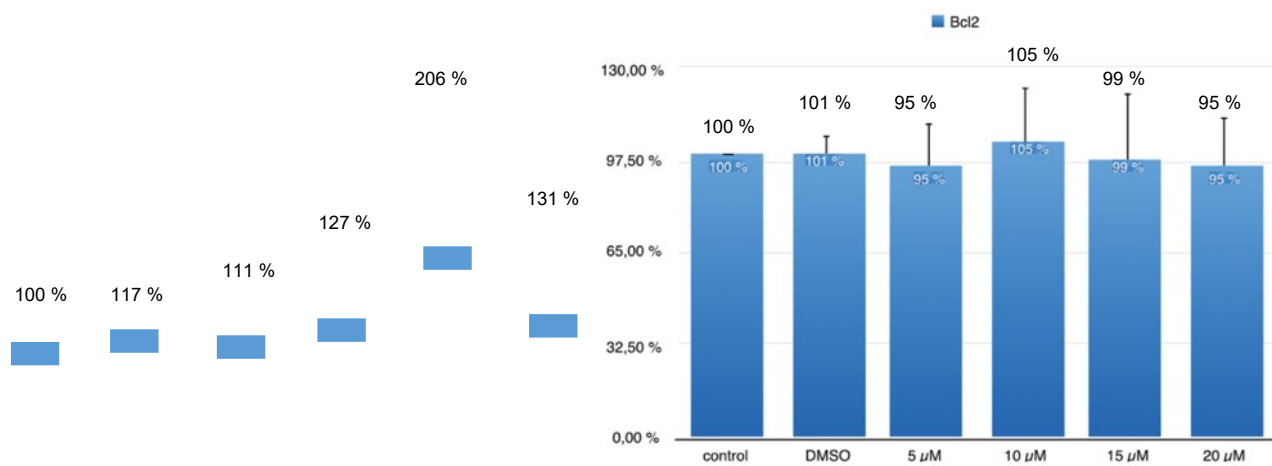


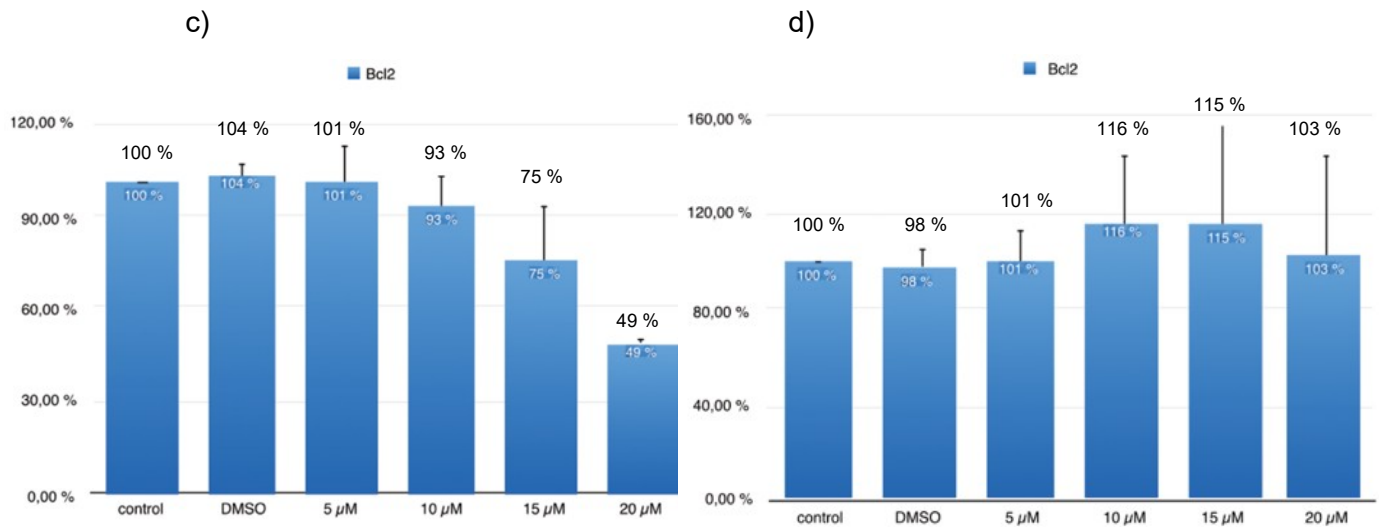


(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 31: *Quantifizierung der Western Blots von β -Catenin nach AR-A014418-Gabe [1].* Eine Abnahme von β -Catenin konnte in den drei untersuchten Zelllinien BON1 (a), QGP1 (b) und H727 (c) nach 48 h und einer Behandlung ab 15 μ M AR-A014418 gezeigt werden, in der Zelllinie GOT1 (d) zeigte sich hingegen eine leichte Zunahme [1].

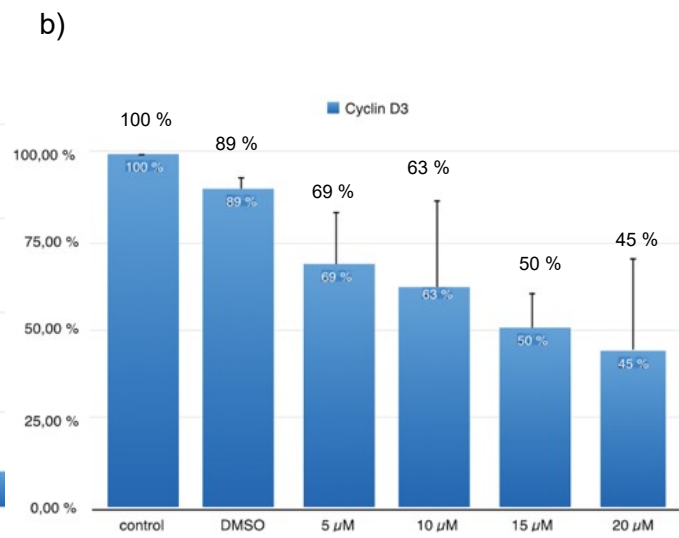
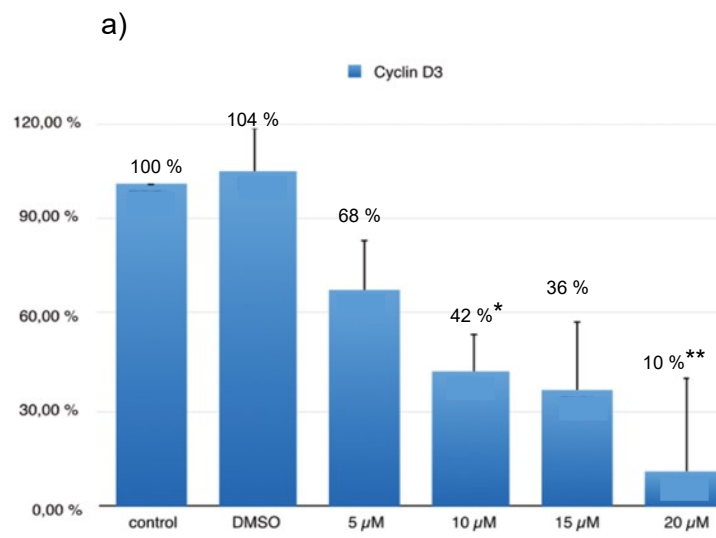


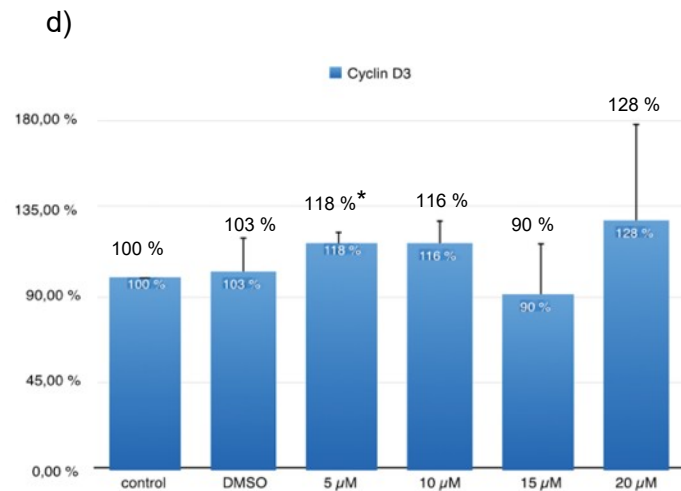
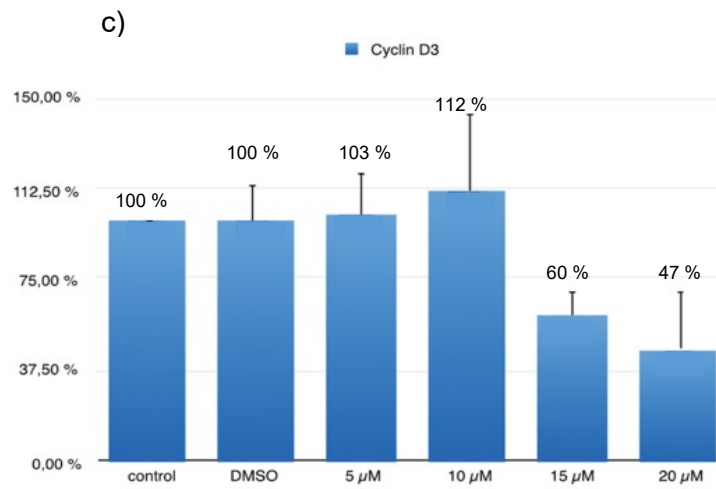




(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

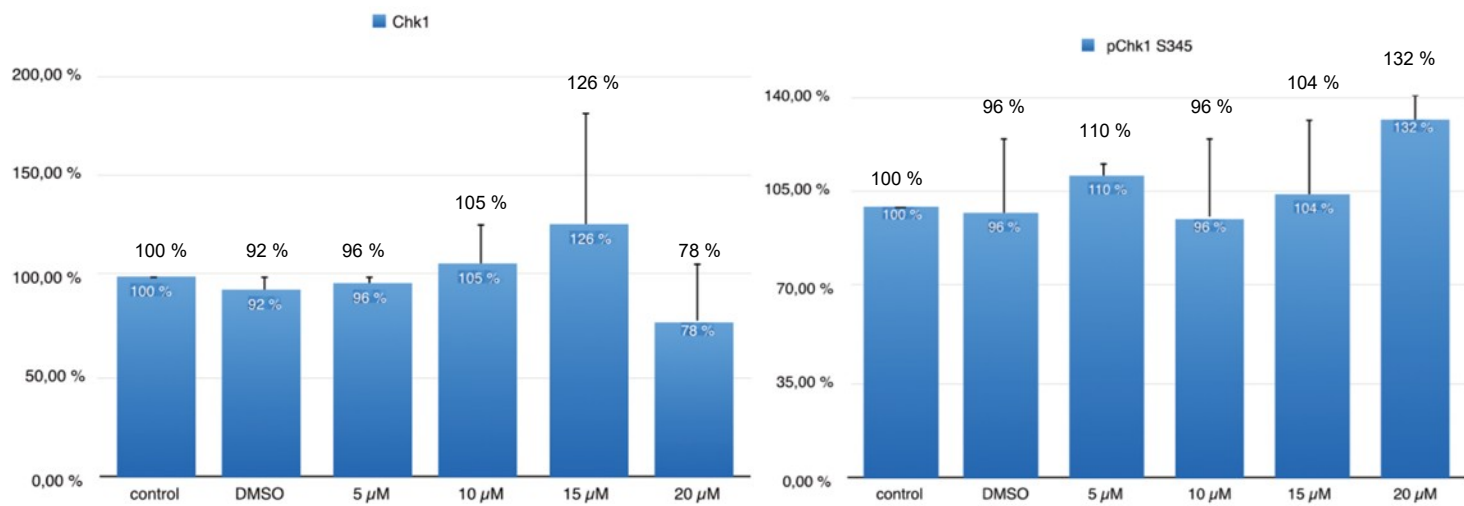
Anhang Abbildung 32: *Quantifizierung der Western Blots von Bcl-2 nach AR-A014418-Gabe [1].* In BON1-Zellen (a) kam es zu einer Zunahme von Bcl-2 nach einer AR-A014418-Behandlung von 48 h, in H727-Zellen (c) fiel es hingegen ab einer AR-A014418-Konzentration von 10 µM ab. In QGP1- (b) und GOT1-Zellen (d) konnte keine Veränderung festgestellt werden [1].





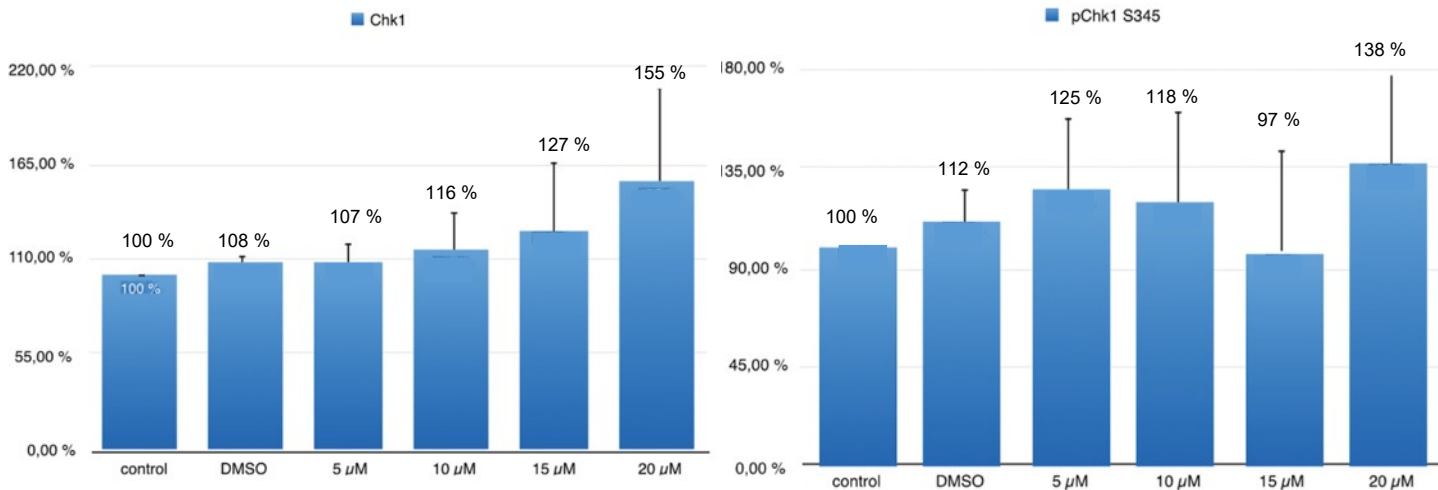
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 33: Quantifizierung der Western Blots von Cyclin D3 nach AR-A014418-Gabe [1]. In BON1- (a) und QGP1- (b)Zellen zeigte sich ein Abfall von Cyclin D3 ab einer AR-A014418-Konzentration von 5 µM nach 48 h, in H727-Zellen (c) zeigte sich erst ab 15 µM ein Abfall, in GOT1-Zellen (d) konnte ein leichter Anstieg bei 20 µM AR-A014418 festgestellt werden [1].



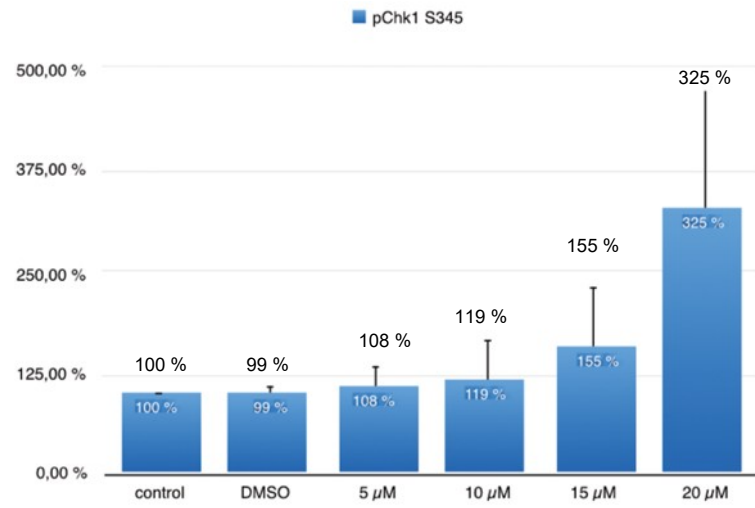
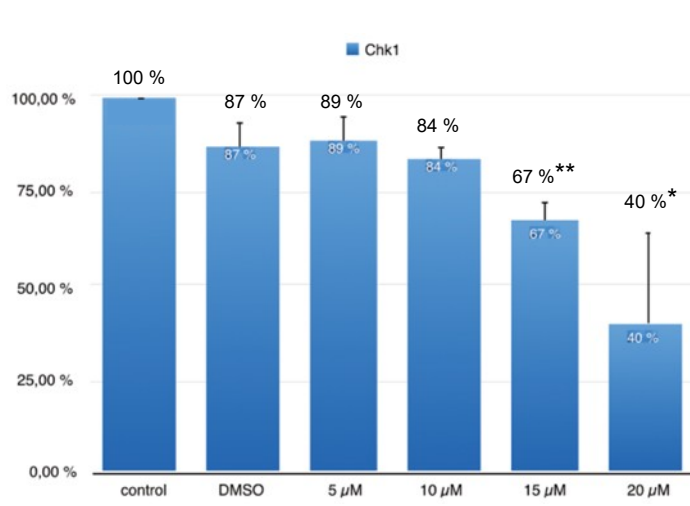
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 34: Quantifizierung der Western Blots von Chk1 nach AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1]. In BON1-Zellen zeigte sich nach 48 h ab AR-A014418-Konzentrationen von 5 μ M ein Anstieg der phosphorylierten/aktivierten Chk1, am deutlichsten ist dieser bei einer Konzentration von 20 μ M zu sehen [1].



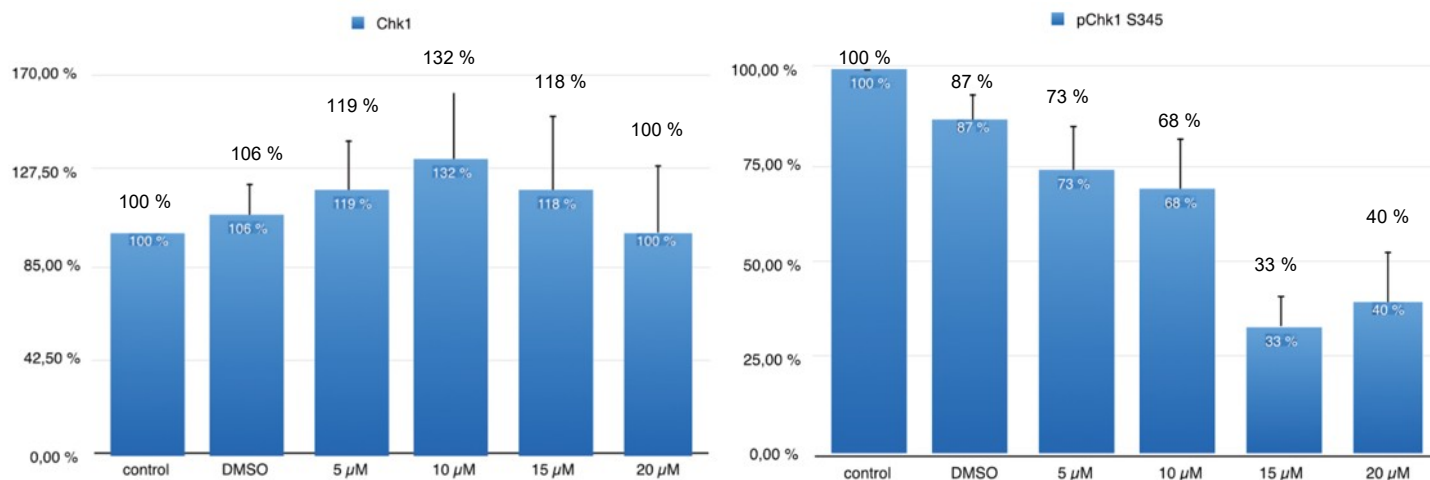
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 35: Quantifizierung der Western Blots von Chk1 nach AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1]. In QGP1-Zellen zeigte sich nach 48 h ab AR-A014418-Konzentrationen von 5 μ M ein Anstieg der phosphorylierten/aktivierten Chk1, am deutlichsten ist dieser bei einer Konzentration von 20 μ M zu sehen [1].



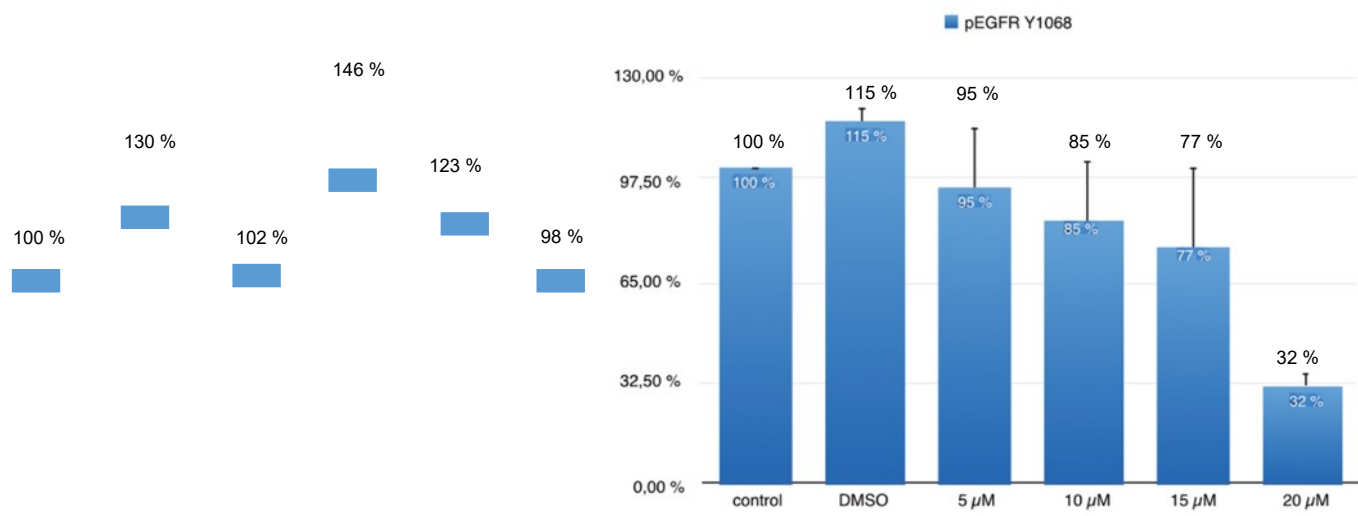
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 36: *Quantifizierung der Western Blots von Chk1 nach AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1].* In H727-Zellen zeigte sich nach 48 h ab AR-A014418-Konzentrationen von 5 μ M ein leichter Anstieg der phosphorylierten/aktivierten Chk1, eine sehr deutliche Zunahme von pChk1 ist bei einer Konzentration von 20 μ M zu sehen [1].

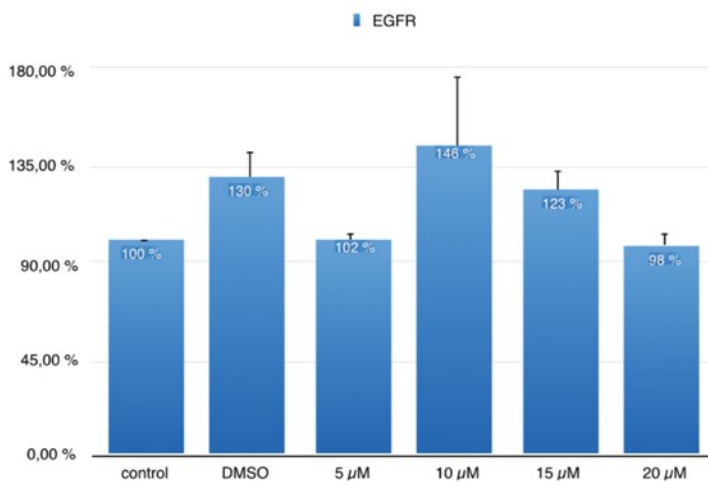


(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

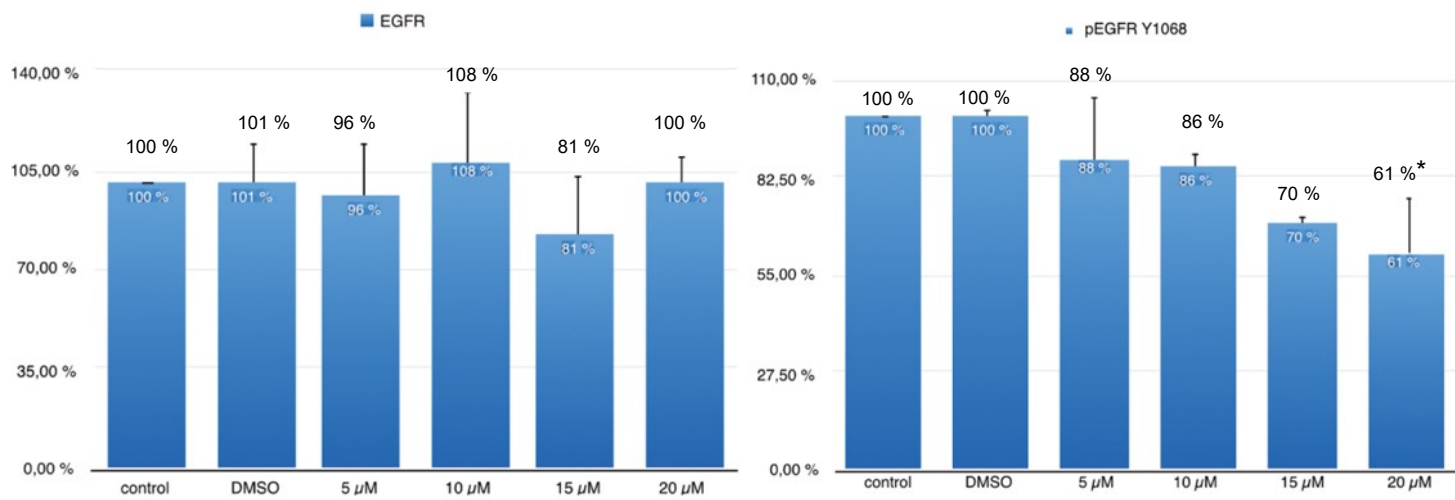
Anhang Abbildung 37: *Quantifizierung der Western Blots von Chk1 nach AR-A014418-Gabe in GOT1-Zellen [1].* In GOT1-Zellen zeigte sich nach 48 h ab AR-A014418-Konzentrationen von 5 µM ein Abfall der phosphorylierten/aktivierten Chk1 [1].



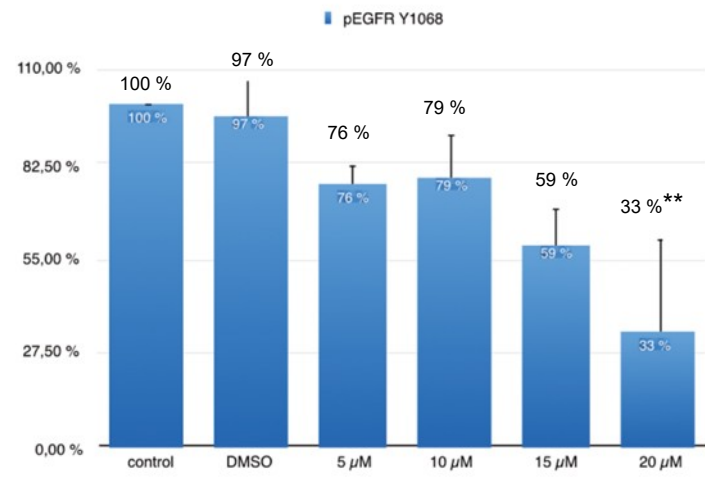
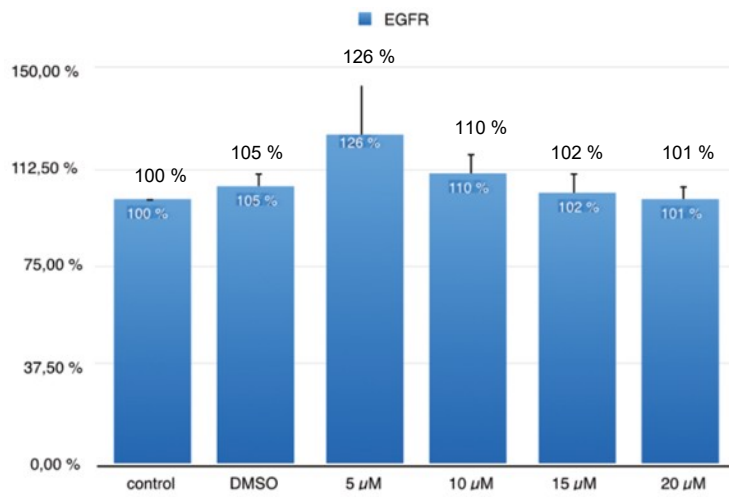
a)



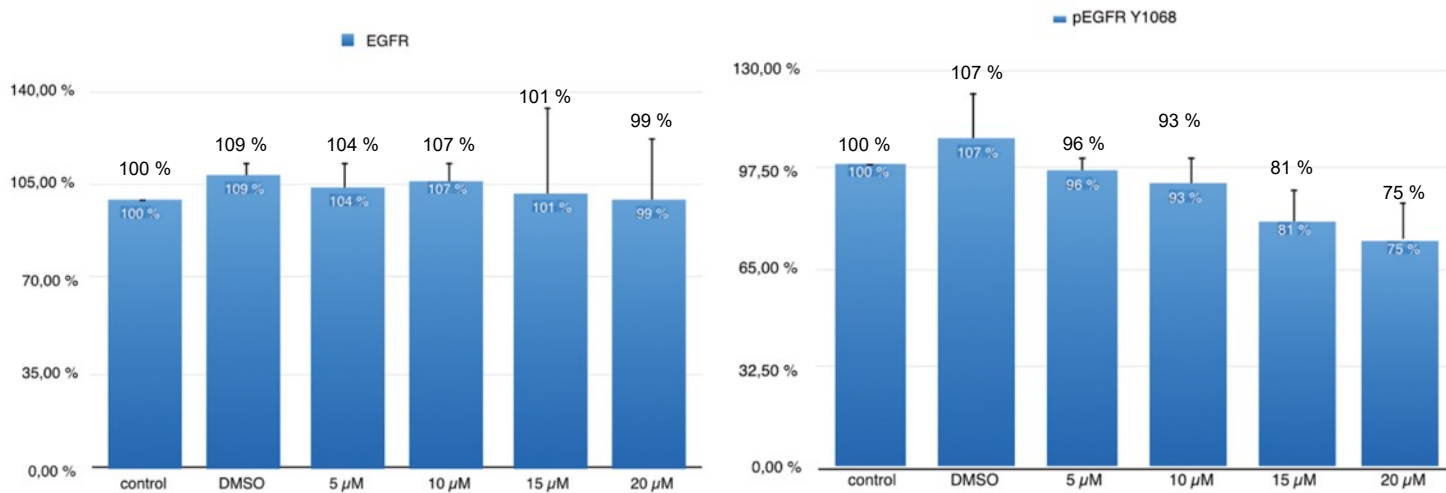
b)



c)

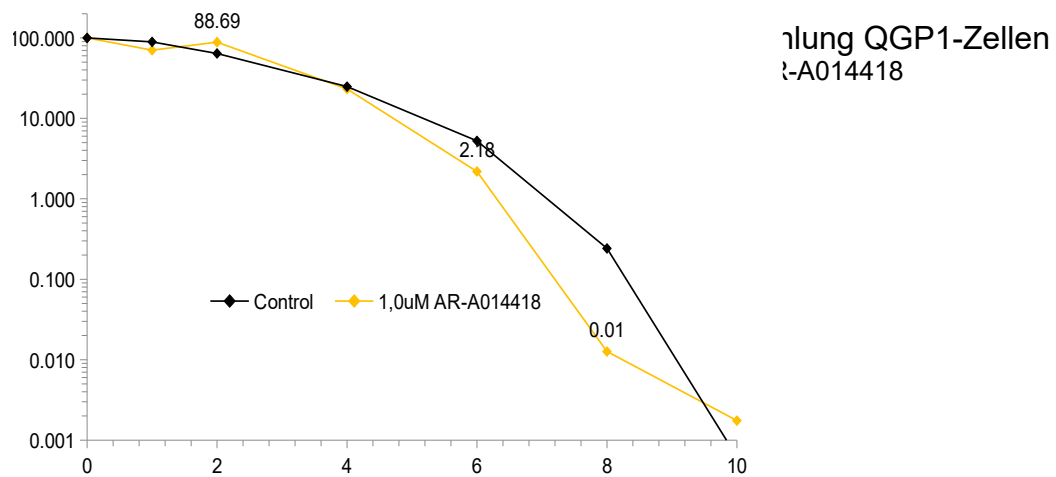


d)



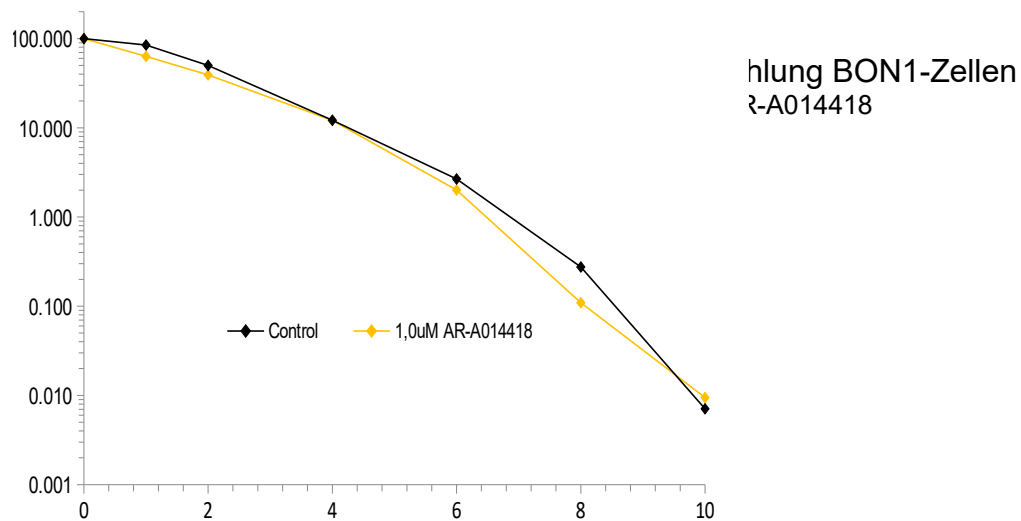
(Control = Medium-Kontrolle; DMSO = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 38: Quantifizierung der Western Blots von EGFR nach AR-A014418-Gabe [1]. In BON1- (a), QGP1- (b), H727- (c) und GOT1- (d) Zellen zeigte sich nach 48 h ab einer AR-A014418-Konzentration von 5 μM eine Phosphorylierung/Hemmung von EGFR, am stärksten war diese bei 20 μM ausgeprägt [1].



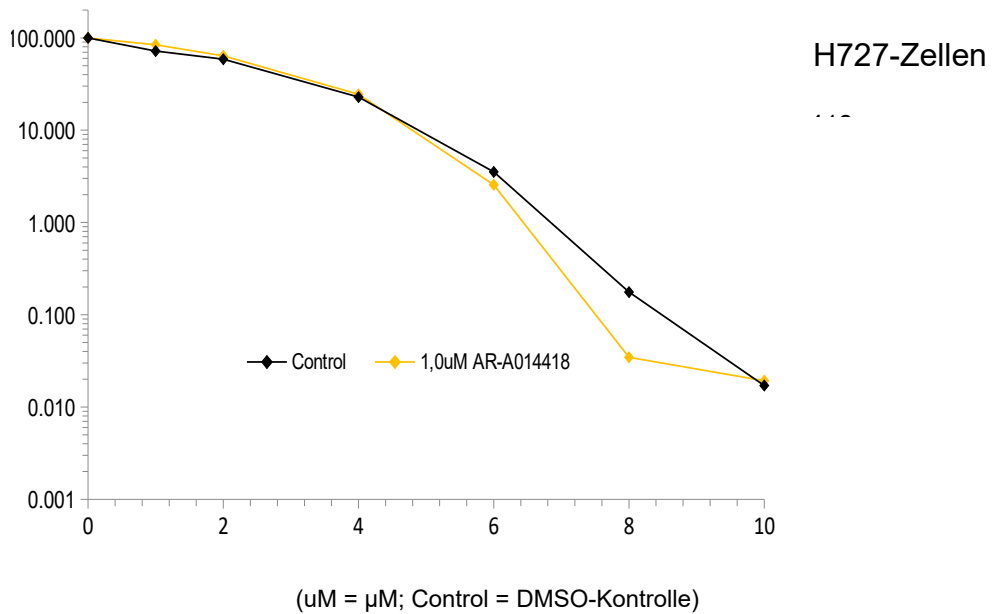
(uM = μ M; Control = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 39: *Bestrahlung nach 1 μ M AR-A014418-Gabe in QGP1-Zellen [1].* In QGP1-Zellen zeigte sich ein statistisch signifikanter radiosensibilisierender Effekt bei einer Vorbehandlung mit 1 μ M AR-A014418 und einer Strahlendosis von 2 Gy, 6 Gy und 8 Gy. Bei einer AR-A014418-Vorbehandlung und einer nachfolgenden Bestrahlung mit 8 Gy fiel die Zellkolonienbildung auf 0,01 %, ohne Vorbehandlung fiel sie auf 0,24 % [1].

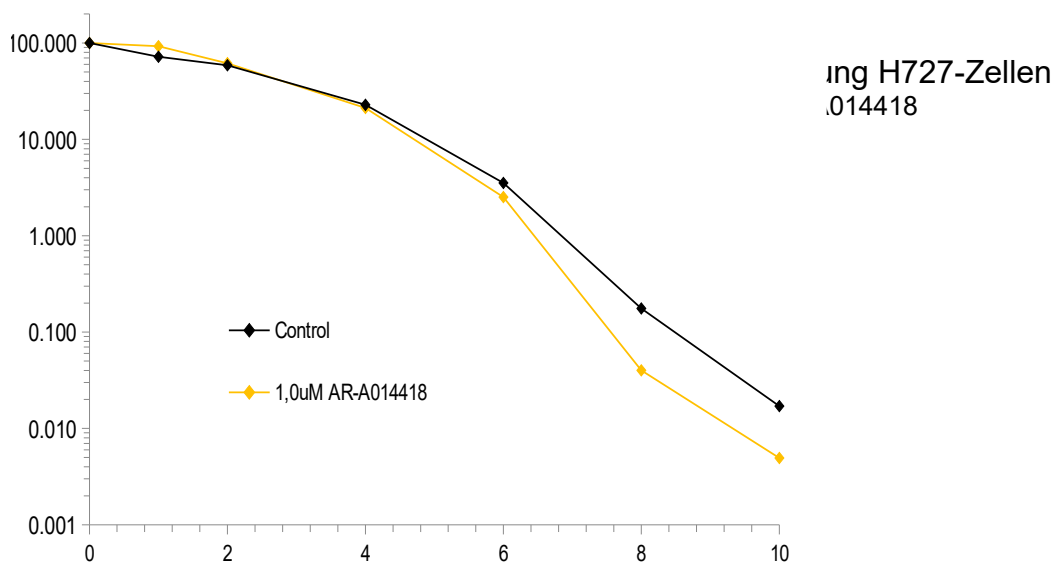


(uM = μ M; Control = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 40: *Bestrahlung nach 1 μ M AR-A014418-Gabe in BON1-Zellen [1].* In BON1-Zellen zeigte sich bei keiner Strahlendosis ein statistisch signifikanter Effekt nach einer Vorbehandlung mit 1 μ M AR-A014418 [1].



Anhang Abbildung 41: *Bestrahlung nach 1 μ M AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1].* In H727-Zellen zeigte sich bei keiner Strahlendosis ein statistisch signifikanter Effekt nach einer Vorbehandlung mit 1 μ M AR-A014418 [1].



(uM = μ M; Control = DMSO-Kontrolle)

Anhang Abbildung 42: *Bestrahlung nach 2 μ M AR-A014418-Gabe in H727-Zellen [1].* In H727-Zellen zeigte sich bei keiner Strahlendosis ein statistisch signifikanter Effekt nach einer Vorbehandlung mit 2 μ M AR-A014418 [1].

VI) Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. Christoph J. Auernhammer, Leiter des Interdisziplinären Zentrums für Neuroendokrine Tumoren des GastroEnteroPankreatischen Systems am Klinikum der Universität München (GEPNET-KUM), für die Aufnahme in seine Forschungsgruppe.

Zudem möchte ich mich bei Dr. med. Svenja Nölting für die Überlassung des Themas meiner Arbeit und die Betreuung bedanken.

Besonderer Dank gilt Dr. rer. biol. hum. Tatjana Aristizabal Prada, Julian Maurer sowie Gerald Spöttl für die gründliche Einarbeitung, jederzeitige Hilfe und große Unterstützung während des experimentellen Teils.

Ebenso möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden für ihre Geduld, offenes Ohr und Unterstützung von Herzen bedanken.

